

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Genética**



**TESIS DOCTORAL**

**DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ESPECIES  
DE *Aspergillus* PRODUCTORAS DE  
OCRATOXINA A**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Amaia González Salgado**

**Bajo la dirección de las doctoras:**

**María Teresa González Jaén y Belén Patiño Álvarez**

**Madrid, 2010**

**ISBN: 978-84-693-2408-0**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ESPECIES DE  
*Aspergillus* PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A**

**TESIS DOCTORAL**

**AMAIA GONZÁLEZ SALGADO**

**MADRID, 2009**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ESPECIES DE  
*Aspergillus* PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A**

Tesis doctoral presentada por  
Amaia González Salgado para optar al  
grado de Doctora en Biología por la  
Universidad Complutense de Madrid.

**Directoras:**

Dra. María Teresa González Jaén  
Profesora Titular de la  
Universidad Complutense de Madrid

Dra. Belén Patiño Álvarez  
Profesora Ayudante Doctor de la  
Universidad Complutense de Madrid

**MADRID, 2009**



**PORTADA**

Fondo: Microfotografía óptica 40X de conidios de *Aspergillus carbonarius*.

Centro: *Aspergillus carbonarius*, cepa 325.

Izquierda: Uvas. Derecha: Campo de trigo.

**CONTRAPORTADA**

Fondo: Microfotografía óptica 40X de conidios de *Aspergillus carbonarius*.

Superior: Estructura química de la ocratoxina

A. Inferior: Esquema de los genes del rDNA y sus regiones espaciadoras ITS e IGS.

**MARCAPÁGINAS**

Fondo: Microfotografía óptica 40X de conidios de *Aspergillus carbonarius*.

Superior: "Campo de Trigo con Cuervos", de Vincent van Gogh.

"Nunca te das cuenta de lo que ya has hecho; sólo puedes ver lo que te queda por hacer".

Marie Sklodowska-Curie (1867-1934)

"Sin duda, el mundo necesita de la ciencia, pero también de algo más (...) que se expresa en una doble cláusula: 1. la ciencia, por sí sola, no puede resolver los graves problemas de la humanidad, 2. pero esos problemas nunca se podrán resolver sin la ciencia. Ni siquiera llegarán a ser entendidos".

Antonio Fernández Rañada (1939- )



Dedicada a "ama" y "apa",  
Carmen y Tamara,  
primeros educadores  
de una futura doctora



## AGRADECIMIENTOS

Parece mentira lo rápido que han pasado estos cuatro años desde la recepción de aquella carta de concesión de una beca predoctoral, momento que siempre tendré grabado en la memoria. Desde entonces numerosas personas me han apoyado y ayudado a lo largo del camino, y ha llegado el momento de recapitular y agradecerlo como bien os merecéis.

GRACIAS: A las responsables del grupo de investigación, la Dra. María Teresa González Jaén, la Dra. Belén Patiño Álvarez, directoras de esta tesis, y la Dra. Covadonga Vázquez Estévez. Maite, quiero agradecerte la confianza que depositaste en mí desde aquella beca de colaboración que se convirtió en una tesis. Muchas gracias por el esfuerzo y el tiempo que me has dedicado en todo momento. Me he sentido prioritaria, especialmente en los últimos meses, lo cual comprendo que ha sido difícil dadas las circunstancias, eres una "jefa" ejemplar. Belén, como ves la historia se repite y en este caso soy tu primera doctoranda. Y como en la otra ocasión me faltan las palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias por tu dedicación y paciencia, por la gran ilusión que has puesto en esta tesis, por todo lo aprendido. Sé que te va a ir muy bien en todo porque te lo mereces. Cova, te agradezco tus constantes palabras de ánimo y apoyo, especialmente en esos momentillos de "crisis", la supervisión y las buenas ideas aportadas en la redacción de este trabajo. Y a las tres, deciros que creo (y lo digo con bastante seguridad) que no voy a encontrarme en ningún otro grupo tan bien como he estado en éste. Habéis dejado el listón muy alto. Y aunque en un futuro no continúe con vosotras... ¡siempre nos quedará Estambul!

A la Dra. Misericordia Jiménez de la Universidad de Valencia por la determinación de OTA de algunos de los aislamientos de este trabajo, y por facilitarnos parte de las cepas utilizadas. A Jorge Muñoz y Guillermo Rodríguez del Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Madrid por la determinación de OTA de gran parte de los ensayos realizados. Además, quiero agradecer de nuevo a la Dra. Lucía Arregui de Microbiología III por su ayuda con las fotografías de los hongos al microscopio, muy aprovechadas desde la tesina como puede verse. A todo el profesorado, ayudantes y personal de los Departamentos de Genética y Microbiología III, por prestarme su ayuda en todo momento y en ocasiones soportar algún despiste. A Rosa de secretaría por su "atención personalizada" durante el tedioso proceso administrativo.

Al Dr. Christian Barreau y a la Dra. Montserrat Ortoneda, que han hecho posible que esta tesis pudiera optar a la mención de doctorado europeo. Gracias por vuestro tiempo y comprensión. Montse, creo que tuve mucha suerte de coincidir contigo en Cork. Estoy segura que no hubiese conseguido gran parte de los resultados descritos sin tu presencia allí durante mi estancia. Espero que nos volvamos a ver pronto y nos podamos tomar unas pintas y charlar como acostumbábamos.

I would like to thank Prof. Alan Dobson, Microbiology Department in University College Cork, for the opportunity to work in his lab and for his help, guidance and suggestions during my internships in Cork. A big thanks also to all in lab 440 and 441 for their advice, help and friendship. It was really appreciated.

A Patri del Dpto. de Genética, por su ayuda y simpatía (¡ánimo guapa!). A la gente del laboratorio 7 (¡8 en el corazón!), en especial a Miguel, gracias por las risas y por aguantarme un poco monotemática estos días (¡"caramelito", me hago doctora, que fuerte!), a Elena (quién me iba a decir a mí que tendría que comprarte un jamón...), a Mirian, la ya "asentada", a Manolo por seguir ahí siempre y por el vistazo a esas conclusiones temidas, a Petra por tu ayuda en todo momento y tus interesantes opiniones sobre la vida, a Jessi por tu actitud siempre positiva y dispuesta a ayudar, a Noelia (no desesperes, la espera merecerá la pena), a María, me has ayudado muchísimo (y muy bien) en la última etapa de experimentos, muchas gracias. A todo el resto de la gente que ha pasado por nuestro grupo o acaba de llegar: Aitor, Salva, Gemita, Mili, Ana, Pablo... Gracias a todos por hacer de nuestro laboratorio un sitio envidiable para trabajar. A las vecinitas del 6, Eva y Mónica. Moni, gracias por tu ayuda estos días, has sido como un "puesto remoto" de la secretaría... y además la "descastá" te da gracias por tu amistad y tu apoyo no sólo en el laboratorio, te voy a echar de menos (sin lagrimillas eh). A los compis del 11 y asociados: Ruth (gracias por el "diseño gráfico"), Andrea, Paco, Mapi y Sara por las charlas de sobremesa y por "adoptarme" de vez en cuando.

A toda nuestra "secta friki" de biólogos. A los que primero conocí en Madrid: Ana (holandesilla mía), Alicia (como buen pony, Europa ya se le queda pequeña...), Asier (siempre serás mi pichurrin nº1), Ali Soriana (me alegro de que estés de nuevo por aquí moco). Quiero agradecerlos que aún estemos en contacto y nos juntemos todos de vez en cuando. A nuestros "postdocs" que ya se han ido: Gaizka, Sonia, Carmen, se os echa de menos (Carmen puedes venir a los carnavales de mi pueblo a por otra copita ya sabes). A Ursu, niña me alegro mucho por ti, siempre me acordaré de estos años con cariño, hemos vivido muchas cosas juntas y dos tesis... te deseo toda la suerte del mundo en esta nueva etapa. Al resto de gente estupenda que he ido conociendo (Ander, Vero, Rodri, Eva, Afri, Lu, Anacris, Oscar, Agi, Fer y un largo etcétera).

A mis compis de piso, Mai y Virgi, por vuestros consejos y apoyo en todo, por esta genial convivencia que se mantiene con los años, y al recién llegado Juan por tu buen humor y alegría sureña (¡ánimo niño!). A mis bilbainillos Sandra, Ana, Elena y Axier por nuestra amistad duradera, de las que pocas se encuentran en la vida. A mis niñas del "gym" Lourdes (gracias por tu ayuda con el italiano) y Ana, por aguantar esas charlas sobre "La Tesis". A mi gente de Villar de Barrio, a Rosa (vamos creciendo juntas, muchas gracias).

A toda mi familia: a la memoria de mis abuelos y abuela Milagros, a la abuela María y a mis tíos y tías, y primos y primas. A mis hermanas Carmen y Tamara por su ayuda y comprensión desde la lejanía, a Aroa por llenar de alegría la familia con su mundo de Lunnis, dordokas y Pressing Catch.

A te, Giovanni, è stata questa tesi di dottorato che ci ha fatto conoscere. È un buon momento per cercare di parlarti un po' in italiano. Grazie mille per quel meraviglioso tempo a Cork che non potrò mai dimenticare, per esserci stato pur essendo le difficoltà, per avere fiducia nel nostro rapporto, per il nostro incontro che per me è stato un colpo di energia e coraggio per continuare ad andare avanti, per essere sempre vicino a me nonostante la distanza, grazie.

Y por último, y porque "somos los genes", el trabajo y esfuerzo que ha supuesto esta tesis se lo dedico con todo el cariño a mis padres, porque lo que llegamos a ser y en lo que nos convertimos, a ellos se lo debemos. En vosotros siempre he tenido un espejo donde reflejarme y unos pilares sólidos donde sostenerme. Gracias por estar siempre ahí con el mejor de los apoyos, el de un padre y una madre.

\*\*\*\*\*

Gracias al Dr. Juan Ramón Lacadena Calero y a la Dra. Concepción Romero Martínez, directores del Departamento de Genética durante la realización de esta tesis, así como al Dr. José Martínez Peinado y a la Dra. Covadonga Vázquez Estévez, directores del Departamento de Microbiología III, por permitirme llevar a cabo este trabajo y por las facilidades concedidas en ambos Departamentos.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias al disfrute de un periodo de dos años de beca y dos de contrato en la Universidad Complutense a cargo del Programa de Ayudas Predoctorales para Formación de Personal Investigador concedido por el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco. Las estancias en University College Cork han estado subvencionadas mediante la obtención de una ayuda para estancias cortas en centros distintos al de aplicación de las becas del Programa de Formación de Investigadores, y a una ayuda paralela a los centros de aplicación, ambas concedidas por el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco.

La finalización y presentación de esta tesis ha estado respaldada gracias a la correspondiente Prestación por Desempleo recibida tras el contrato. Mi más sincero agradecimiento a todos los miembros de la FJI, Euskobekadunak, Precarios Madrid y Precarios Estatal por el tiempo invertido en la consecución de estos logros (gracias de nuevo especialmente a Enero).

La investigación desarrollada ha sido financiada por el proyecto AGL2004-07549-c05-05/ALI, concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y por el proyecto UCM-CM-961014, concedido por la Universidad Complutense de Madrid.





# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1. El género <i>Aspergillus</i> .....	15
1.1. Sección <i>Nigri</i> .....	20
1.1.1. <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	22
1.1.2. Agregado <i>Aspergillus niger</i> .....	23
1.1.3. <i>Aspergillus japonicus</i> .....	24
1.2. Sección <i>Circumdati</i> .....	24
1.3. Sección <i>Flavi</i> .....	26
2. Micotoxinas.....	28
3. Ocratoxina A.....	32
3.1. Estructura química de las ocratoxinas.....	32
3.2. Hongos productores de ocratoxina A.....	34
3.3. Factores implicados en la producción de ocratoxina A y su presencia en productos alimenticios.....	35
3.4. Toxicología.....	37
3.5. Legislación actual.....	38
3.6. Biosíntesis de ocratoxina A.....	40
3.6.1. Superfamilia citocromo P450.....	43
3.6.2. Poliquétido sintasas.....	44
4. Aflatoxinas.....	45
5. Detección e identificación de especies fúngicas contaminantes de alimentos.....	47
5.1. PCR-RFLPs.....	48
5.2. RAPDs.....	49
5.3. PCR-AFLPs.....	49
5.4. PCR con cebadores específicos.....	49
5.5. RT-PCR.....	51
5.6. PCR cuantitativa.....	52
6. Prevención y control de micotoxinas en alimentos.....	54
7. Objetivos.....	57

1. Condiciones de cultivo y mantenimiento de cepas.....	61
2. Obtención de suspensiones de esporas.....	61
3. Diagnóstico mediante PCR de especies de <i>Aspergillus</i> .....	61
3.1. Aislamiento de DNA	61
3.2. Electroforesis de DNA	62
3.3. Amplificación de la región ITS en <i>Aspergillus</i>	63
3.4. Clonación de fragmentos amplificados por PCR	63
3.5. Purificación de DNA plasmídico	64
3.6. Purificación de productos de PCR	64
3.7. Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias	64
3.8. Diseño de cebadores específicos	65
3.9. Ensayos de PCR	66
3.10. Digestiones con endonucleasas de restricción	68
4. Detección de hongos toxígenos en uvas de vino.....	68
5. Detección de hongos toxígenos en cereales.....	70
6. Ensayos de PCR a tiempo real para la detección de DNA genómico de <i>A. carbonarius</i> .....	72
6.1. Diseño de cebadores	72
6.2. Reacciones de PCR a tiempo real con SYBR Green I	72
6.3. Reacciones de PCR a tiempo real con sonda TaqMan	73
6.4. Curvas estándar	74
6.5. Especificidad del ensayo	75
6.6. Método de contaminación de uvas con cepas de <i>A. carbonarius</i>	75
7. Identificación de genes implicados en la ruta de biosíntesis de ocratoxina A en <i>A. ochraceus</i> y <i>A. carbonarius</i> .....	76
7.1. Paseo cromosómico ("Genome walking")	76
7.2. PCR con cebadores degenerados	78
8. Determinación de condiciones de cultivo óptimas para producción y no producción de ocratoxina A en <i>A. carbonarius</i> .....	80
9. Análisis de la expresión de los genes <i>p450</i> y <i>AckS9</i> de <i>A. carbonarius</i> mediante RT-PCR a tiempo real.....	81
9.1. Extracción de RNA total	81
9.2. Electroforesis de RNA	81
9.3. Síntesis de cDNA	82
9.4. Reacciones de RT-PCR a tiempo real	83
10. Ensayos de toxicidad con fungicidas.....	84

11. Cuantificación de ocratoxina A.....	85
---	----

---

<b>RESULTADOS</b>	<b>87</b>
-------------------	-----------

---

1. Ensayos de PCR específicos para la detección de especies de <i>Aspergillus</i> toxígenas.....	89
1.1. Ensayos de PCR específicos para la detección de especies de <i>Aspergillus</i> pertenecientes a la sección <i>Nigri</i>	89
1.2. Ensayo de PCR específico para <i>Aspergillus ochraceus</i>	97
1.3. Ensayo de PCR específico para <i>Aspergillus flavus</i>	100
2. Aplicación de los ensayos de PCR desarrollados.....	102
2.1. Análisis de hongos aislados de uvas de vino de las Comunidades de Castilla-León y La Rioja	102
2.2. Análisis de cepas de <i>Aspergillus</i> en cebada y trigo blando de Castilla-León y Castilla-La Mancha	105
3. Detección y cuantificación de <i>A. carbonarius</i> mediante PCR a tiempo real.....	108
4. Identificación de genes implicados en la ruta de biosíntesis de ocratoxina A en <i>A. ochraceus</i> y <i>A. carbonarius</i> .....	115
4.1. Obtención de la secuencia completa del gen <i>p450-B03</i> en <i>A. ochraceus</i> mediante paseo cromosómico	115
4.2. Identificación del gen homólogo del citocromo <i>aocrp450</i> en <i>A. carbonarius</i> mediante cebadores degenerados	123
5. Análisis de la expresión de los genes <i>p450</i> y <i>AckS9</i> de <i>A. carbonarius</i> mediante RT-PCR a tiempo real.....	127
5.1. Cinética de la producción de ocratoxina A por <i>A. carbonarius</i> en un medio de cultivo sólido	127
5.2. Cuantificación de la expresión de los genes <i>acarp450</i> y <i>AckS9</i> en relación con la producción de ocratoxina A mediante RT-PCR a tiempo real	128
6. Efecto de los fungicidas mancozeb y benomilo sobre la producción de OTA y la expresión de los genes <i>acarp450</i> y <i>AckS9</i> mediante RT-PCR a tiempo real.....	133

---

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>141</b>
------------------	------------

---

1. Ensayos de PCR específicos para especies de <i>Aspergillus</i> toxígenas.....	143
1.1. Ensayos para la detección de <i>A. ochraceus</i> y especies de <i>Aspergillus</i> pertenecientes a la sección <i>Nigri</i>	143
1.2. Ensayo de PCR específico para <i>Aspergillus flavus</i>	146

2. Análisis de aislamientos de <i>Aspergillus</i> en uvas de vino de las Comunidades de Castilla-León y La Rioja.....	147
3. Detección de cepas de <i>Aspergillus</i> en cebada y trigo blando de Castilla-León y Castilla-La Mancha.....	151
4. Detección y cuantificación de <i>A. carbonarius</i> mediante PCR a tiempo real.....	154
5. Identificación de genes implicados en la ruta de biosíntesis de ocratoxina A en <i>A. ochraceus</i> y <i>A. carbonarius</i> .....	156
5.1. Obtención de la secuencia completa del gen <i>aocrp450</i> mediante paseo cromosómico	156
5.2. Identificación del gen homólogo del citocromo <i>aocrp450</i> mediante cebadores degenerados	159
6. Análisis de la expresión de los genes <i>acarp450</i> y <i>AckS9</i> de <i>A. carbonarius</i> mediante RT-PCR a tiempo real.....	161
6.1. Producción de ocratoxina A por <i>A. carbonarius</i>	161
6.2. Análisis de la expresión de los genes <i>acarp450</i> y <i>AckS9</i> y su relación con la producción de ocratoxina A en <i>A. carbonarius</i>	164
7. Efecto de dos fungicidas en la producción de ocratoxina A y en la expresión de los genes <i>acarp450</i> y <i>AckS9</i> en <i>A. carbonarius</i> .....	167
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>173</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>181</b>

## ABREVIATURAS

<b>AFLP</b>	Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos Amplificados
<b>BEN</b>	Nefropatía Endémica de los Balcanes
<b>cDNA</b>	DNA complementario del mRNA
<b>C<sub>T</sub></b>	Ciclo umbral ( <i>threshold</i> )
<b>CYA</b>	Agar Czapek Extracto de Levadura
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetracético
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	Factor de Elongación 1 $\alpha$
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EMBL</b>	Laboratorio Europeo de Biología Molecular
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>FAD/FMN</b>	Flavín Adenín Dinucleótido/Flavín Mononucleótido
<b>HACCP</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>IGS</b>	Espaciador Intergénico del rDNA
<b>ITS</b>	Espaciador Intergénico Transcrito del rDNA
<b>ISO</b>	Organización Internacional para la Estandarización
<b>JECFA</b>	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
<b>LC</b>	Cromatografía Líquida
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>MMWR</b>	Informe Semanal de Morbilidad y Mortalidad
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>NADPH</b>	Nicotín-adenín-dinucleótido-fosfato
<b>NRPS</b>	Sintetasa de Péptidos No Ribosomales
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>pb</b>	Pares de bases

<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDA</b>	Agar patata dextrosa
<b>PKS</b>	Poliquétido Sintasa
<b>PNUMA</b>	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
<b>PR</b>	Periodo de Referencia
<b>Pu</b>	Purina
<b>Py</b>	Pirimidina
<b>qPCR</b>	PCR Cuantitativa
<b>RAPD</b>	DNA Polimórfico Amplificado al Azar
<b>RASFF</b>	Sistema Rápido de Alertas para Alimentos y Semillas
<b>rDNA</b>	DNA ribosómico
<b>RFLP</b>	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT</b>	Transcripción inversa
<b>TAE</b>	Tampón Tris-Acetato y EDTA
<b>Tris</b>	Tris-hidroxil-aminometano
<b>YES</b>	Agar Extracto de Levadura Sacarosa

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC

# RESUMEN

---





## RESUMEN - DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE ESPECIES DE *Aspergillus* PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A

El género *Aspergillus* tiene una considerable importancia para la sociedad debido a la capacidad que presentan algunas de sus especies de producir enzimas y ácidos orgánicos. Sin embargo, algunas especies de *Aspergillus* también producen deterioro y contaminación de ciertos sustratos alimentarios y sintetizan micotoxinas, entre las que aflatoxinas y ocratoxina A destacan por su importancia. La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario con propiedades neurotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas sobre animales, y además ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno en humanos (del grupo 2B). Las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA son *A. ochraceus* en la sección *Circumdati*, y *A. carbonarius* y los dos miembros del agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), en la sección *Nigri*. Se ha observado presencia de OTA en numerosos alimentos y bebidas, especialmente en cereales, café, uvas y vino, y su contenido máximo en diversos productos alimentarios está regulado por la Unión Europea.

Para minimizar la entrada de OTA y otras micotoxinas en la cadena alimentaria, es muy importante la obtención de herramientas de diagnóstico rápido, para poder monitorizar los puntos de control críticos de forma efectiva. Sin embargo, el reconocimiento de las numerosas especies del género *Aspergillus* es difícil y requiere expertos en taxonomía, ya que tradicionalmente se han empleado métodos basados en características morfológicas. Por esta razón, el primer objetivo del presente trabajo fue desarrollar ensayos de PCR específicos para la distinción de las principales especies de *Aspergillus* toxígenas (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. ochraceus* y *A. flavus*), y otras especies relacionadas de la sección *Nigri*. Así, se han descrito ocho ensayos, basados en la técnica de PCR, para la detección de las especies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. ochraceus* y *A. flavus*. Los cebadores están diseñados mediante la comparación de secuencias de la región espaciadora intergénica del rDNA, ITS, en diversas cepas y especies de *Aspergillus*, y se ensayaron en un gran número de aislamientos de diferentes orígenes y hospedadores. Los ensayos de PCR, basados en secuencias multicopia, son rápidos, sensibles y específicos, y representan una buena herramienta para la detección

temprana de algunas de las principales especies de *Aspergillus* toxígenas, y para la prevención de la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria.

En los últimos años, se ha intentado establecer cuáles son las principales especies fúngicas toxígenas presentes en cereales, uvas y productos derivados. Por ello, en un segundo objetivo, los protocolos de PCR descritos anteriormente fueron aplicados en la detección de especies de *Aspergillus* en dos importantes agro-productos, como son las uvas de vino y los cereales. En el primer caso, se analizó la presencia de especies de *Aspergillus* productoras de OTA en aislamientos de uvas de vino de las Comunidades españolas de Castilla-León y La Rioja. Dichos aislamientos se clasificaron primeramente usando métodos morfológicos convencionales, y posteriormente fueron identificados con los protocolos de PCR descritos para especies productoras de OTA. Los niveles de producción de OTA de los aislamientos se analizaron mediante HPLC. Los resultados indicaron la presencia de especies del agregado *A. niger*, aunque sus niveles de producción de OTA no fueron muy elevados, mientras que solamente un aislamiento correspondió a la especie *A. ochraceus*, y no se detectaron aislamientos de *A. carbonarius*. La ausencia de aislamientos de *A. ochraceus* y *A. carbonarius* puede ser debida a las características climáticas de la zona, situada en las zonas interiores de la península.

Así mismo, se analizó la presencia de las principales especies toxígenas de *Aspergillus* en muestras de trigo y cebada, en semilla de precosecha y almacenaje, de las Comunidades de Castilla-León y Castilla-La Mancha. El método incluía extracción directa de DNA de las muestras incubadas durante 5 días, y análisis con los métodos de PCR descritos para las especies de *Aspergillus* toxígenas. En cereal de precosecha sólo se detectó contaminación con *A. flavus* y *A. carbonarius*, mientras que en semilla seca los niveles de contaminación con *A. flavus* fueron más patentes, y también se detectó *A. carbonarius* y especies del agregado *A. niger*, pero no *A. ochraceus* ni *A. japonicus*. Aunque el número de muestras analizadas no era elevado, la detección de contaminación con *A. flavus* y *A. carbonarius* en semillas de precosecha indica una probable fuente de contaminación en las semillas de almacenaje. Los resultados también indican cierto riesgo de aflatoxinas y OTA en cereales de esas regiones.

La reducción de contaminación de OTA puede llevarse a cabo con la detección temprana de las especies fúngicas productoras de OTA mediante el uso de métodos de

PCR no sólo cualitativos, sino también con una mayor precisión usando métodos cuantitativos. El tercer objetivo de la presente tesis fue el desarrollo de protocolos de qPCR para la detección directa y cuantificación de *A. carbonarius* en uvas. Como en los casos anteriores, los ensayos estaban basados en secuencias multicopia (ITS) y se comparó la eficiencia de dos metodologías, SYBR Green I y TaqMan, con el objetivo de establecer la más conveniente para la detección de *A. carbonarius* en uvas. La especificidad y sensibilidad de ambos métodos se evaluó en DNA extraído de varios hongos y en mezclas de DNA de *A. carbonarius* con DNA de otras especies de *Aspergillus* y cepas de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*. Los resultados mostraron señales de amplificación altamente específicas y más sensibles que otros ensayos previamente descritos para *A. carbonarius*. Con el objetivo de demostrar la eficacia de los métodos sobre alimentos, se llevó a cabo un procedimiento de inoculación de esporas en uvas, que permitió detectar un mínimo de  $10^6$  esporas sin necesidad de incubación. La eficiencia y sensibilidad de ambos métodos SYBR Green y TaqMan fue similar, aunque el bajo coste del reactivo SYBR Green podría favorecer su uso para análisis rutinarios.

La ruta de biosíntesis de OTA aún no ha sido totalmente elucidada en ninguna especie fúngica. Debido a la ausencia de datos en especies de *Aspergillus*, nuestro cuarto objetivo se centró en la identificación y caracterización de genes implicados en la ruta biosintética de OTA en las especies *A. ochraceus* y *A. carbonarius*. En primer lugar, se empleó la técnica de paseo cromosómico para amplificar el gen completo *p450-B03*, a partir de su fragmento inicial descrito por O'Callaghan *et al.* (2006) y positivamente correlacionado con la síntesis de OTA en *A. ochraceus*. De esta manera, hemos obtenido una parte del *cluster* de OTA en *A. ochraceus*, incluyendo los genes *p450-B03*, *nrps* y el anteriormente descrito *pks* (O'Callaghan *et al.* 2003). El siguiente paso fue el aislamiento de fragmentos de citocromos P450 de *A. carbonarius* mediante el uso de PCR con cebadores degenerados. Se diseñaron cuatro cebadores degenerados, que se utilizaron para la amplificación de DNA genómico de *A. carbonarius*. Uno de los productos de PCR clonados mostró elevada similitud con genes *p450* fúngicos.

Una vez clonado un gen P450 en *A. carbonarius*, el quinto objetivo fue desarrollar un protocolo para la detección y cuantificación de la expresión de dicho gen, posiblemente implicado en la biosíntesis de OTA en *A. carbonarius*, mediante RT-PCR a tiempo real. Así, se evaluó la expresión del gen obtenido, denominado *acarp450*, y adicionalmente

la expresión del gen pks *AcKS9* (descrito por Atoui *et al.* 2006), en condiciones permisivas y restrictivas de producción de OTA. Para la realización de este objetivo, se seleccionaron primeramente dos medios y condiciones de incubación que mostraron producción de OTA (CYA, pH 6, 20°C), y no producción (YES, pH 8.3, 28°C), en diferentes cepas de *A. carbonarius*. Se diseñaron dos parejas de cebadores para los genes *acarp450* y *AcKS9*, respectivamente, se extrajo RNA total y se obtuvo el correspondiente cDNA de las cepas cultivadas en ambos medios durante 5 días. Los resultados de expresión se normalizaron mediante la comparación con amplificaciones del gen de la  $\beta$ -tubulina en la misma placa. Se obtuvo una correlación positiva entre la producción de OTA y la expresión de ambos genes *acarp450* y *AcKS9*, indicando que pudieran estar implicados en la biosíntesis de OTA en *A. carbonarius*.

En los últimos años, ha habido una cierta presión social para reducir el uso de conservantes y fungicidas en productos alimentarios. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que el uso de cantidades reducidas de estos compuestos pueden estimular la síntesis de micotoxinas. El sexto y último objetivo consistió en el estudio del efecto de fungicidas comerciales en el crecimiento, producción de OTA y expresión de los genes anteriormente mencionados, mediante el protocolo de RT-PCR a tiempo real desarrollado. Se cultivaron dos cepas de *A. carbonarius* en presencia de dos concentraciones diferentes de los fungicidas mancozeb y benomilo. Se analizó la producción de OTA mediante HPLC, y la expresión de los genes *acarp450* y *AcKS9*. Los resultados indicaron que la producción de OTA disminuyó con altas concentraciones de fungicida, mientras que a bajas concentraciones se produjo más OTA. Por otra parte, los dos fungicidas y dosis redujeron ligeramente la expresión del gen *acarp450*, pero la expresión del gen *AcKS9* fue la misma con la adición de benomilo, y se vio aumentada en el caso del mancozeb a las dos concentraciones. Sin embargo, se deben hacer estudios adicionales para confirmar estos resultados.

Podemos concluir que los protocolos descritos en esta tesis proporcionan herramientas de diagnóstico rápido y específico de especies de *Aspergillus* productoras de OTA, para su aplicación en diferentes alimentos como uvas y cereales. La clonación de posibles genes implicados en la biosíntesis de OTA en *A. ochraceus* y *A. carbonarius* proporcionará información adicional para la elaboración de nuevas estrategias de control de OTA en alimentos, y el conocimiento de los factores bióticos y abióticos que afectan a su producción.

# ABSTRACT

---



**ABSTRACT - DETECTION AND CONTROL OF OCHRATOXIN A-PRODUCING SPECIES IN THE GENUS *Aspergillus***

*Aspergillus* species have a considerable importance because of their ability to produce enzymes and organic acids. However, *Aspergillus* species can also cause food spoilage and produce mycotoxins, among which aflatoxins and ochratoxin A are the most important. Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite with nephrotoxic, immunotoxic, genotoxic and teratogenic properties towards several animal species, and has been classified by the International Agency for Research on Cancer as possible carcinogen to humans (group 2B). The main toxigenic *Aspergillus* species are the OTA-producing *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and the two members of the *A. niger* aggregate (*A. niger* and *A. tubingensis*). Additionally, *A. flavus* is responsible of aflatoxin production in agro-products. OTA occurs in various foodstuffs and beverages, specially cereals, coffee, grapes, wine and beer, and its maximum limit on several commodities for human consumption are under legal regulation.

Prevention of OTA and other mycotoxins entering the food chain requires specific and rapid diagnostic tools to effectively monitor the critical control points. Recognition of the several species of *Aspergillus* genus is difficult and requires considerable expertise using conventional methods based on morphological features. So, the first objective of this work was to develop specific PCR assays to discriminate the main food spoilage and toxigenic *Aspergillus* species and another related species included in section *Nigri*. In total, eight assays were developed to detect *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. ochraceus* and *A. flavus*. The species specific primers were designed on the basis of the ITS (internal transcribed spacers of rDNA units) sequence comparisons obtained from *Aspergillus* strains, and were tested in a number of strains from different origins and hosts. These PCR assays, based on multi-copy sequences, are highly sensitive and represent a good tool for an early detection of OTA- and aflatoxin-producing *Aspergillus* species.

These protocols were optimized to be used in two important agro-products, wine grapes and cereals, where toxin contamination frequently occurs. In the first case, presence of OTA-producing species was analyzed on 51 fungal isolates from wine grapes collected from two important wine producing Spanish regions (Castilla-León and La Rioja). OTA-producing species were isolated and determined using conventional



methods. Identification was then confirmed using the PCR assays developed in this work. OTA production by the isolates was measured by HPLC. The results indicated the presence of *A. niger* aggregate species presenting a low ochratoxigenic levels, while only one isolate of *A. ochraceus* and no *A. carbonarius* were detected. This could be due to the differences in climatological conditions with respect to Mediterranean areas.

Additionally, diagnosis of the presence of toxigenic *Aspergillus* species was analyzed on barley and wheat seeds from fields of different Spanish regions (Castilla-León and Castilla-La Mancha), at both pre- and post-harvest stages. The method included direct DNA extraction from 5 days incubated cereal samples and analysis by the PCR specific assays developed in this work for the toxigenic *Aspergillus* species. In pre-harvest samples, only *A. flavus* and *A. carbonarius* were detected at low levels, while in post-harvest samples *A. flavus* was detected at higher values. *A. carbonarius* and *A. niger* aggregate were also detected, but *A. ochraceus* was not present. Although the number of samples analyzed was low, the detection of *A. flavus* and *A. carbonarius* in low amounts in pre-harvest barley and soft wheat suggested that field contamination might be the probable source of contamination of stored grains by those species. The results also indicated that certain risk of OTA and aflatoxins associated to crops might exist in this region.

Real-time PCR is a reliable, accurate and rapid option to quantify DNA from fungi. The third objective of the thesis was to develop qPCR protocols for the direct detection and quantification of *A. carbonarius* to be used in grapes. The assays were based on multicopy sequences (ITS) and the efficiency of both approaches, SYBR Green I and TaqMan, was compared in order to establish the most convenient one for OTA-producing *A. carbonarius* screening in grapes. The specificity and sensitivity of both assays was tested on DNA extracted from various fungi and on mixes of genomic DNA from *A. carbonarius* and other *Aspergillus* species, as well as strains from the genera *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*. The results showed a highly specific and more sensitive amplification signal than other assays reported so far for *A. carbonarius*. In order to test the efficiency of these methods under practical conditions, an enrichment procedure for grapes was developed, which allowed us to detect at least  $10^6$  spores without incubation. The efficiency and sensitivity of both methods were comparable, and only the lower cost of SYBR Green might favour its use in routine screenings.

The complete OTA biosynthetic pathway has not yet been fully elucidated in any fungal species, in particular in the case of *Aspergillus* species. The fourth objective of this project was to identify and characterize genes involved in the OTA biosynthetic pathway in *A. ochraceus* and *A. carbonarius*. In this work, the full open reading frame of the cytochrome P450 gene *p450-B03* was obtained in *A. ochraceus* by a genome walking approach. A partial region of this gene had been previously obtained and its expression could be positively correlated with OTA biosynthesis (O'Callaghan *et al.*, 2006). Additionally, sequences of a non ribosomal peptide synthase (NRPS) gene, and a polyketide synthase (PKS) gene putatively involved in OTA synthesis (O'Callaghan *et al.* 2003), were identified in the adjacent 3' region of the *p450-B03* gene. Those results would support the organization of OTA biosynthetic genes in a cluster, as other toxin biosynthetic genes in fungi. Subsequently, our next step was to isolate part of cytochrome P450 monooxygenases from *A. carbonarius* by using degenerate PCR. Four degenerate primers were designed and subsequently used to amplify genomic DNA from *A. carbonarius*. One of the cloned PCR products displayed high sequence identity to the fungal cytochrome P450 monooxygenase genes. On the other hand, previous works on the expression of the pks *AckS9* gene developed in our lab (first described by Atoui *et al.* 2006) correlated with OTA biosynthesis.

Once genomic sequences from putative OTA biosynthetic genes were identified in *A. carbonarius*, specific protocols were developed for the obtained *p450* gene, named *acarp450*, and the *AckS9* gene, to detect and quantify their expression by real-time PCR in permissive and restrictive conditions for OTA production. For this purpose, two different media and conditions were selected which showed positive (CYA, pH 6, 20°C) or negative OTA production (YES, pH 8.3, 28°C) for a number of *A. carbonarius* strains. RNA and cDNA were obtained from the fungi cultured for 5 days in both media. The expression results were normalized using  $\beta$ -tubulin as constitutively expressed gene to be run on the same plate. A positive correlation between OTA production and expression of both *acarp450* and *AckS9* genes was observed, supporting that these genes may be involved in OTA biosynthesis.

In recent years, there has been an increasing demand to reduce the use of preservatives and fungicides in food products. However, some studies have suggested that the use of suboptimal concentrations of these substances may rather lead to stimulation of mycotoxin production. The sixth and last objective of the present work

was to study the effect of commercial fungicides on fungal growth, OTA production and the expression of the genes above mentioned using the specific real time RT-PCR protocols developed. Two *A. carbonarius* strains were grown in presence of two different concentrations of the fungicides mancozeb and benomyl. The OTA production was analyzed by HPLC, as well as the expression of the *acarp450* and *AckS9* genes. The results indicated that OTA production was reduced with the highest concentrations of both fungicides, while OTA levels were increased at low concentrations of the fungicides. On the other hand, the expression of both genes was different under the tested conditions. Both fungicides and concentrations slightly reduced the expression of the *acarp450* gene, but the expression remained at similar values for *AckS9* gene in benomyl supplemented cultures, or even increased in the case of mancozeb at the two concentrations. Further studies need to be performed in order to confirm these results.

In conclusion, the protocols reported in this thesis provide effective and rapid diagnostic tools for the early detection of OTA producing *Aspergillus* species in different commodities, such grapes and cereals. The cloning of putative OTA biosynthetic genes in *A. ochraceus* and *A. carbonarius* provide additional evidence of the organization of OTA biosynthetic genes in a cluster and a useful approach to obtain relevant knowledge on the biotic and abiotic factors affecting OTA production and to develop effective strategies to control OTA contamination of foods.

# INTRODUCCIÓN

---



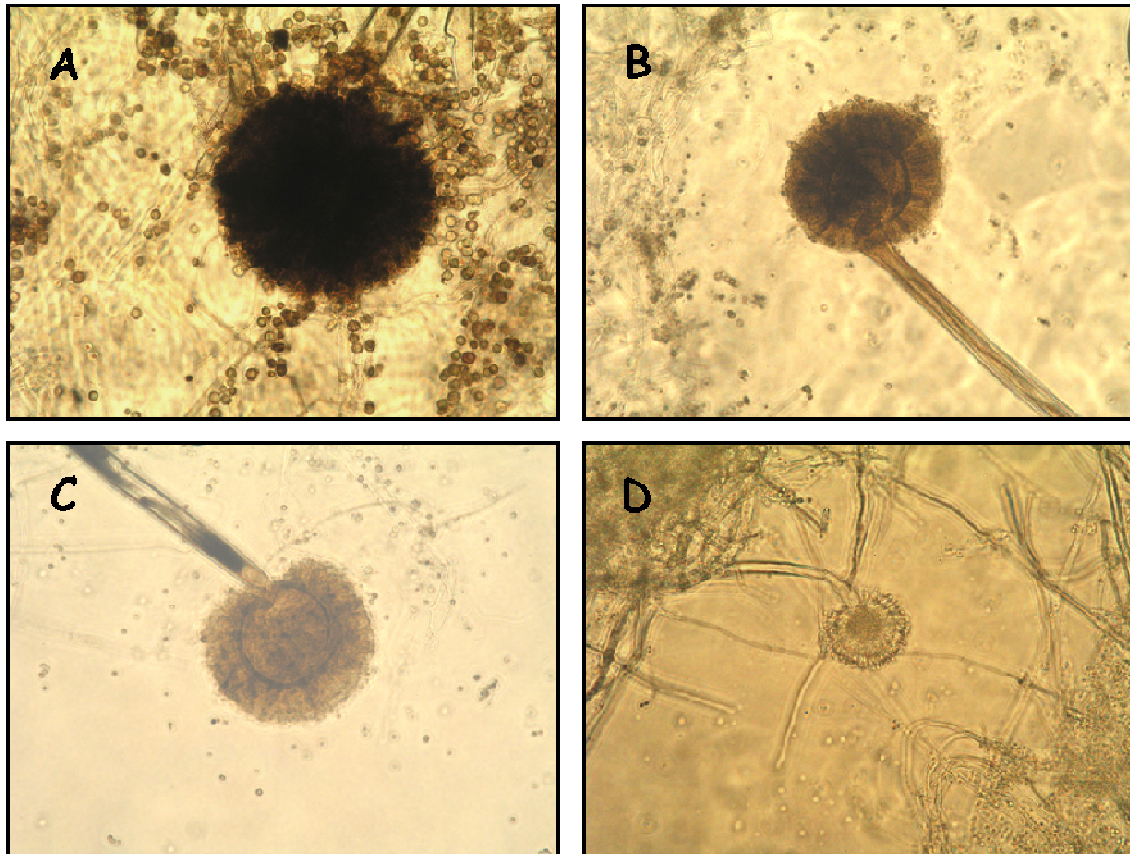
## 1. EL GÉNERO *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, que marcó el punto de partida de la micología como ciencia en su obra "*Nova Plantarum Genera*". La denominación del género se debe a la similitud morfológica de la cabeza conidial con un "aspergillum" (instrumento religioso utilizado para dispersar el agua bendita). ([http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/historical\\_papers/index.php~main](http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/historical_papers/index.php~main)). Posteriormente, el término fue validado por Link en 1809. Este género está encuadrado dentro del orden *Eurotiales*, y pertenece a la familia *Trichocomaceae*.

En la clasificación de los hongos filamentosos, el tipo de reproducción es un factor importante. Tradicionalmente, el género *Aspergillus* se incluía dentro de los deuteromicetos (subd. *Deuteromycotina*) u "hongos imperfectos", porque en ellos no se había podido encontrar la forma sexual o teleomórfica, es decir, sólo se les conocía la forma asexual o anamórfica y por ello no podían clasificarse como ascomicetos, basidiomicetos o zigomicetos. Los deuteromicetos se clasifican en base a su morfología asexual aunque en la actualidad se les conozca la forma teleomórfica (sexual) (Carlile *et al.*, 2001), hecho que sólo ocurre en el 5% de las especies descritas (Seifert y Gams, 2001). En el caso de *Aspergillus*, aproximadamente un tercio de las especies descritas poseen forma sexual conocida (Geiser, 2008). Los principales géneros en los que se agrupan las formas teleomórficas de *Aspergillus* son *Eurotium* y *Emericella*. La sección *Circumdati*, a la que pertenece *Aspergillus ochraceus*, posee el género teleomorfo *Neopetromyces* (Frisvad y Samson, 2000), mientras que la sección *Flavi* (*Aspergillus flavus*) se asocia a miembros del género teleomorfo *Petromyces* (Subramanian, 1972).

La primera monografía del género *Aspergillus* publicada reunía 150 especies, clasificadas en 18 grupos (Raper y Fennell, 1965). Esta clasificación estaba basada en la identificación clásica de las diferentes especies mediante la observación de sus características morfológicas macro y microscópicas como morfología de la colonia y pigmentación, tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y presencia de células de Hülle. En la Figura 1.1 se puede observar la morfología microscópica de algunas de las especies del género *Aspergillus* que se estudian en este trabajo.

Posteriormente, Gams *et al.*, (1985) revisaron el trabajo inicial realizado por Raper y Fennell, adaptaron las especies descritas al Código Internacional de Nomenclatura Botánica, y dividieron las especies en subgéneros y secciones, esquema de clasificación que sigue empleándose en la actualidad.



**Figura 1.1.** Microfotografías ópticas 40X de conidios y cabezas conidiales o conidióforos de *Aspergillus carbonarius* (A), *Aspergillus niger* (B), *Aspergillus tubingensis* (C) y *Aspergillus ochraceus* (D).

El número de especies de *Aspergillus* reconocidas ha ido modificándose gracias a la construcción de filogenias bioquímicas y moleculares, y a la aplicación del concepto filogenético de especie. La última recopilación de especies de uso actual reunía 182 (Pitt *et al.*, 2000). En otro artículo de la misma publicación, a esa lista se añadían otras 36, publicadas entre 1992 y 1999 (Samson, 2000). Desde entonces, se han descrito más de 40 nuevas especies, por lo que el número en la actualidad llega a ser de, aproximadamente, 250 especies distintas caracterizadas por los taxónomos (Geiser *et al.*, 2007), que siguen siendo objeto de continuas revisiones.





La importancia de este género es notable para el ser humano. Algunas especies se han utilizado desde antiguo para la producción de sustancias como aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y metabolitos secundarios. *Aspergillus niger* es la principal especie utilizada para la producción de ácidos orgánicos, básicamente ácido cítrico y ácido glucónico (Pariza y Johnson, 2001; Papagianni, 2007). El ácido cítrico es uno de los principales aditivos en la industria alimentaria, utilizándose, entre otros productos, en refrescos, zumos de frutas, mermeladas, caramelos y vino. En la producción industrial de enzimas, esta especie también ha sido utilizada como productora de catalasa (Hjort, 2003; Wösten *et al.*, 2007).

Otra especie con especial importancia dentro del género es *Aspergillus oryzae*, que ha sido empleada, entre otras aplicaciones, para la producción de  $\alpha$ -amilasa, enzima de amplio uso en la industria panadera (Wösten *et al.*, 2007). En Asia, y en menor medida en países de África y América del Sur, se utiliza desde hace casi 2000 años como fermento natural en la producción de alimentos tradicionales, principalmente el *koji*, una masa elaborada a partir de cereales y leguminosas fermentadas que constituye la base del *miso*, la salsa de soja o el sake (Baker y Bennett, 2008).

Los productos obtenidos de ambas especies *A. niger* y *A. oryzae* poseen la Categoría General de Alimentos Seguros (GRAS: "Generally Recognized as Safe") de la Agencia Estadounidense de Alimentación y Medicamentos (FDA: "Food and Drug Administration") (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=184&>).

Los hongos del género *Aspergillus* se multiplican rápidamente sobre materia vegetal almacenada o en descomposición, de interés agro-alimentario (cereales, frutas, semillas, etc.), y en un amplio rango de temperatura, humedad y aerobiosis, contaminando así muchos sustratos (Pointing y Hyde, 2001; Perrone *et al.*, 2007). Algunas de sus especies son fitopatógenas, destacando nuevamente *A. niger*, que produce, entre otras enfermedades, la antracnosis del algodón y el carbón (Oelofse *et al.*, 2006).

Sin embargo, es por su capacidad de producir diversas enfermedades de distribución universal en el ser humano y animales por lo que su estudio y conocimiento en los últimos años ha aumentado en gran medida (Denning, 2006).

La primera descripción de una patología provocada por *Aspergillus* la hacen Meyer y Emmert en 1815, que descubrieron la enfermedad pulmonar en el grajo. En 1847, Sluyter publica la primera descripción de neumomicosis humana causada por *Aspergillus*, y tres años más tarde, Fresenius cultiva el hongo a partir de las lesiones del tracto respiratorio en pájaros y denomina a la especie aislada *Aspergillus fumigatus*, introduciendo además el término Aspergilosis.

En un sentido amplio, las Aspergilosis se definen como el daño a los tejidos provocados por hongos del género *Aspergillus* (Vanden Bossche, 1988). De las ya mencionadas 250 especies de *Aspergillus* descritas, solamente 8 son responsables de la mayoría de infecciones en humanos. *Aspergillus fumigatus* es el patógeno más común, seguido de *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niveus* y, finalmente, *A. ustus* (Kradin y Mark, 2008). Los síntomas de las Aspergilosis engloban manifestaciones de cuatro tipos: micotoxicosis, enfermedades alérgicas, colonizaciones saprofitas o crónicas y enfermedades invasoras o sistémicas (Denning, 2006). La gravedad de la Aspergilosis depende de varios factores, aunque uno de los más determinantes es el estado del sistema inmune del enfermo (Vonberg y Gastmeier, 2006). Así, se comportan como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (pacientes con Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH, transplantados, pacientes oncológicos...).

Una característica importante de ciertos hongos del género *Aspergillus* es su capacidad de producir toxinas. Si éstas se producen sobre alimentos de consumo, su presencia representa un riesgo para la salud. Las principales micotoxinas producidas por *Aspergillus* son las aflatoxinas y las ocratoxinas (Perrone *et al.*, 2007). Otras micotoxinas, como la patulina, esterigmatocistina, citrinina y el ácido penicílico, también pueden ser producidas por algunos hongos de este género. A continuación, se describen brevemente las principales secciones del género *Aspergillus* en las que se basa este trabajo.

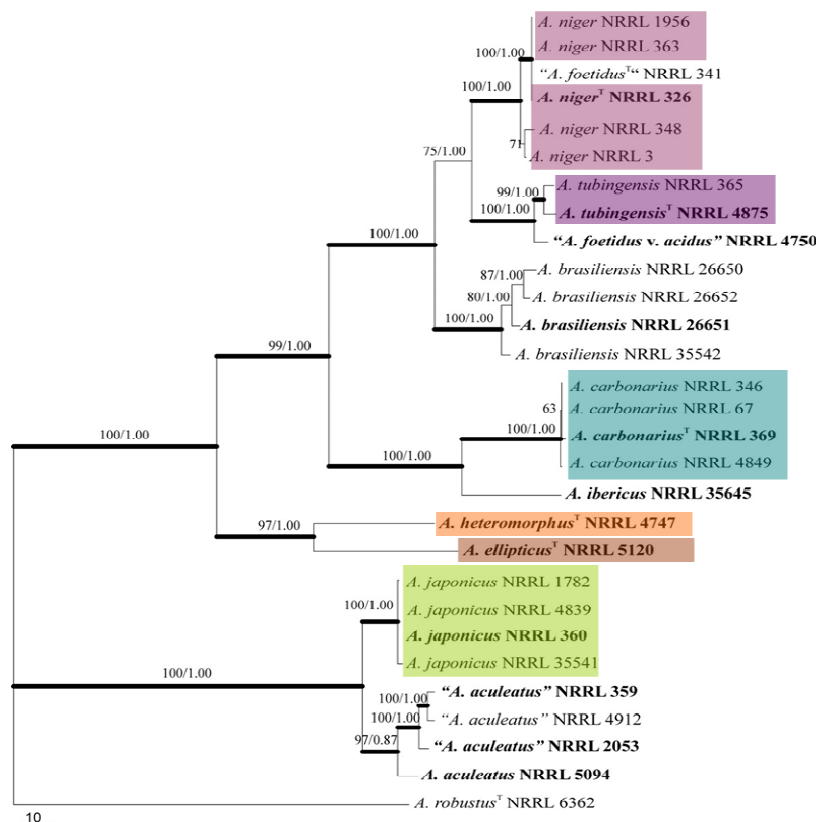
### 1.1. SECCIÓN *Nigri*

Las especies de *Aspergillus* de color negro, incluidas dentro de la sección *Nigri*, han sido ampliamente estudiadas durante los últimos setenta años, sobre todo mediante la utilización de criterios morfológicos (Parenicová *et al.*, 2000a). A pesar de ser intenso objeto de estudio y de que en los últimos años también se han utilizado criterios bioquímicos y moleculares para su clasificación, ésta aún sigue siendo controvertida y problemática.

Mediante la introducción de herramientas moleculares, el número de especies incluidas dentro de esta sección fue reducido de 13, según las referencias de distintos autores (Thom y Church, 1926; Raper y Fennell, 1965), a únicamente 6 especies (Kusters-van Someren *et al.*, 1990, 1991; Samson, 1992, 1994; Pitt *et al.*, 2000), que son *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus* y el agregado *A. niger*, que incluye las especies *A. niger* y *A. tubingensis*. Otros autores han sugerido la separación de los miembros de esta sección en tres grupos, aquellos con cabezas conidiales uniseriadas, biseriadas y *A. carbonarius* (Battilani *et al.*, 2003b). Las diferencias en el número de especies reconocidas por diferentes autores demuestran las dificultades en el establecimiento de criterios claros para la identificación de especies incluidas en esta sección.

En el año 2004, Abarca *et al.* realizaron una amplia revisión de la sección *Nigri*, describiendo la problemática taxonómica y la importancia de las distintas especies de la sección descritas hasta ese momento. En el mismo año, Samson *et al.* describieron cuatro nuevas especies, aceptando un total de 15 taxones: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. tubingensis* y *A. vadensis*. Los autores basaron la diferenciación entre las distintas especies en los perfiles de 8 metabolitos secundarios y en algunas características morfológicas. A esta clasificación se le han ido añadiendo posteriormente nuevas propuestas de especies, como *A. ibericus* (Serra *et al.*, 2006a), *A. uvarum* (Perrone *et al.*, 2008), *A. sclerotii carbonarius* y *A. aculeatinus* (Noonim *et al.*, 2008). Un repaso histórico y resumen de la clasificación actual de la sección *Nigri* puede encontrarse en Samson *et al.*, 2007. Los autores elaboran varios árboles filogenéticos, aunque no ofrecen un dendrograma consenso. Sin embargo, en 2008,

Peterson obtiene un dendrograma consenso para la sección *Nigri*, el cual se representa en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Árbol filogenético consenso de la sección *Nigri* basado en las secuencias de la región ITS, calmodulina y RNA polimerasa II (Peterson, 2008). Se destacan en color las especies objeto de este estudio.

Algunas especies de hongos pertenecientes a la sección *Nigri* han sido descritas como capaces de producir ocratoxina A, micotoxina objeto de este estudio y descrita con detalle en el Apartado 3 de "Introducción". Estas especies son *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994), *A. carbonarius* (Horie, 1995), *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotiumniger* (Samson *et al.*, 2004) y *A. tubingensis* (Medina *et al.*, 2005). Dentro de las especies de este grupo, *A. carbonarius* muestra el potencial ocratoxígeno más alto, tanto en el porcentaje de especies productoras como en los valores de ocratoxina A producidos (Serra *et al.*, 2006a; Samson *et al.*, 2007).

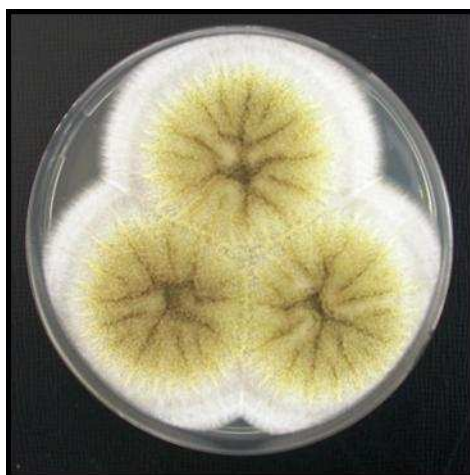
La producción de ocratoxina A por miembros de esta sección se observa principalmente en uvas y productos derivados, como uvas pasas y vino (Samson *et al.*, 2007). Concretamente, se ha propuesto que *A. carbonarius* es el principal hongo

responsable de la producción de esta toxina en uvas de vino en el Mediterráneo (Pitt, 2000; Battilani *et al.*, 2003b; Medina *et al.*, 2005; Perrone *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2006b; Leong *et al.*, 2007).

### 1.1.1. *Aspergillus carbonarius*

Dentro de la sección *Nigri*, *Aspergillus carbonarius* (Figura 1.4) se diferencia claramente del resto debido a características morfológicas, como sus conidios de gran tamaño y ornamentación equinulada (Figura 1.1). Las técnicas de RFLPs del rDNA y mtDNA, RAPDs y secuenciación de las regiones espaciadoras del rDNA permiten diferenciar claramente *A. carbonarius* del resto de especies del agregado *A. niger* (Figura 1.3) (Varga *et al.*, 2000a; González-Salgado, 2004; Samson *et al.*, 2007).

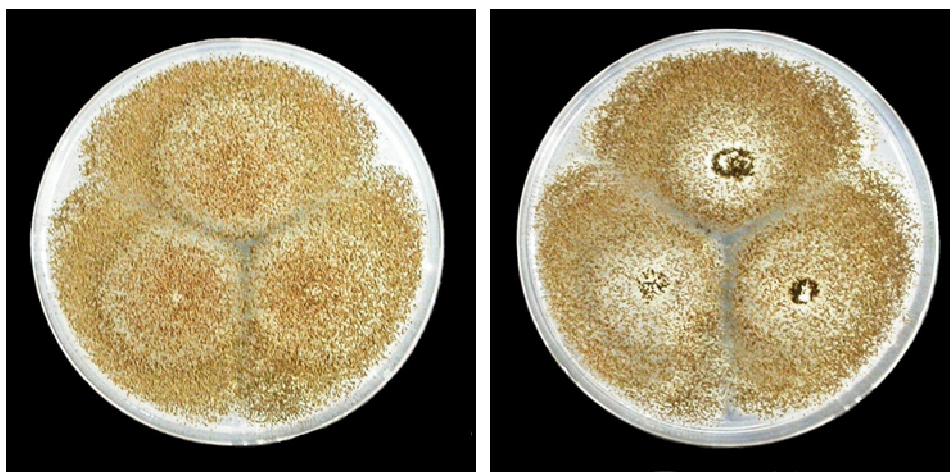
Se ha observado *A. carbonarius* en frutos y otros vegetales, principalmente en uvas y productos derivados, durante la época de recolección o almacenamiento de los mismos. Aparece sobre todo en climas mediterráneos, cálidos y secos durante la época estival (Perrone *et al.*, 2007).



**Figura 1.4.** *A. carbonarius*. Cepa 325 cultivada en medio CYA durante 5 días.

### 1.1.2. Agregado *Aspergillus niger*

La diferenciación en base a la morfología de las distintas especies y variedades del agregado *A. niger* es extremadamente difícil, por lo que las distintas propuestas de clasificación de este grupo generaron en su origen un gran número de taxones (Al-Musallam, 1980; Kozakiewicz, 1989). Los diversos estudios moleculares y bioquímicos realizados con cepas del agregado *A. niger* han intentado aclarar su clasificación. En 1991, Kusters-van Someren *et al.*, mediante el uso de RFLPs, dividieron al agregado en las especies *A. niger* y *A. tubingensis* (Figura 1.5), indistinguibles morfológicamente. Esta división fue repetidamente confirmada en estudios posteriores (Ménégneau *et al.*, 1993; Visser *et al.*, 1996; Parenicová *et al.*, 1997). En los últimos años, diversos autores han propuesto la división del agregado en 4 especies morfológicamente idénticas: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis* (Samson *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2007), de las cuales solamente *A. niger* y *A. tubingensis* son capaces de producir ocratoxina A (Abarca *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 2005).



**Figura 1.5.** Especies de *Aspergillus* incluidas en el agregado *A. niger*: *A. niger*, cepa CECT 2091 (izquierda) y *A. tubingensis*, cepa T.TT.A2 (derecha), cultivadas en medio CYA durante 5 días.

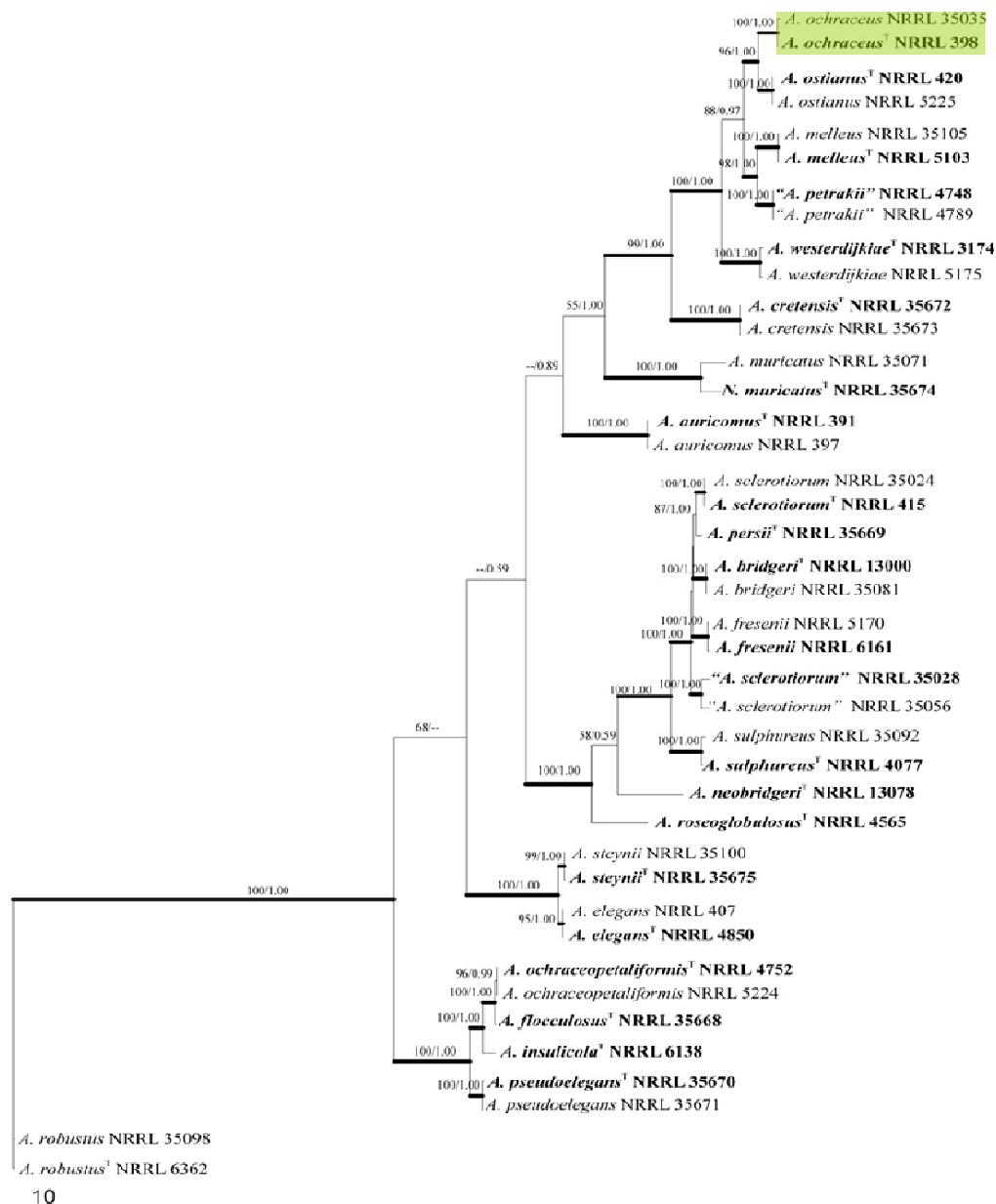
### 1.1.3. *Aspergillus japonicus*

Es una de las especies uniseriadas de la sección *Nigri*. En los estudios iniciales, *Aspergillus japonicus* incluía dos variedades: *A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus*, que se diferenciaban por el tamaño de las vesículas. Algunos autores comenzaron a considerar estas dos variedades como especies distintas (Raper y Fennell, 1965; Pitt y Hocking, 1997; Parenicová *et al.*, 2001). Por ello, la mayoría de los estudios moleculares realizados con cepas de *A. japonicus* se han dirigido a aclarar esta controversia.

Yokoyama *et al.* (2001) consideraron a los dos taxones como una especie única basándose en estudios de DNA mitocondrial. Así mismo, Abarca *et al.* (2004) también observaron que las dos variedades uniseriadas de la sección poseían la secuencia del rDNA idéntica, y que por tanto podrían representar una sola especie utilizando este criterio. Sin embargo, en los últimos años se las ha descrito como especies diferentes en casi todos los trabajos publicados (Samson *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2006a; Samson *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2008; Noonim *et al.*, 2008).

### 1.2. SECCIÓN *Circumdati*

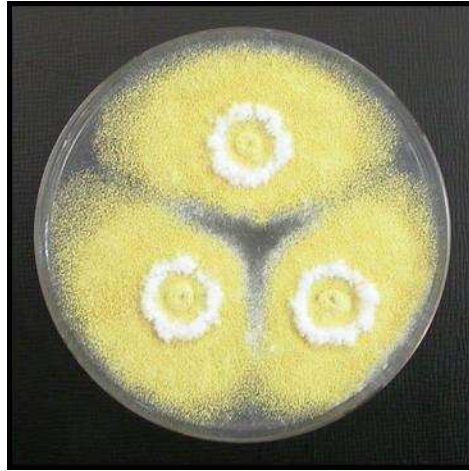
*Aspergillus ochraceus* fue inicialmente descrito como la especie más frecuente dentro de la sección *Circumdati* (Gams *et al.*, 1985), anteriormente llamado "Grupo *Aspergillus ochraceus*" según Raper y Fennell en 1965. La lista de especies y cepas incluidas en esta sección ha ido modificándose, especialmente desde el uso de secuencias y marcadores genómicos. De esta manera, se añadieron especies nuevas y se transfirieron otras a diferentes secciones (*Flavi*, *Candidi* y *Wentii*), dando lugar, finalmente, a una sección *Circumdati* homogénea, con hongos más estrechamente relacionados (Peterson, 2000). En 2004, se propusieron 7 nuevas especies, de las cuales todas, excepto una, se describieron como productoras de ocratoxina A (Frisvad *et al.* 2004a). La filogenia obtenida por Peterson (2008), para la sección *Circumdati*, se representa en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Árbol filogenético consenso de la sección *Circumdati* basado en las secuencias de la  $\beta$ -tubulina, calmodulina, ITS y RNA polimerasa II (Peterson, 2008). Se destaca en color la especie objeto de este estudio.

*A. ochraceus* recibe su nombre por el color ocre de las colonias que forma (Figura 1.7). El hábitat natural de *A. ochraceus* y especies relacionadas es vegetación seca, semillas y frutos. Ha sido frecuentemente aislado sobre granos de café, cereales y diferentes vegetales almacenados, y en climas cálidos y tropicales (Pardo *et al.*, 2006). Esta especie, junto con *Penicillium verrucosum*, fueron inicialmente descritos como los principales hongos productores de ocratoxina A.

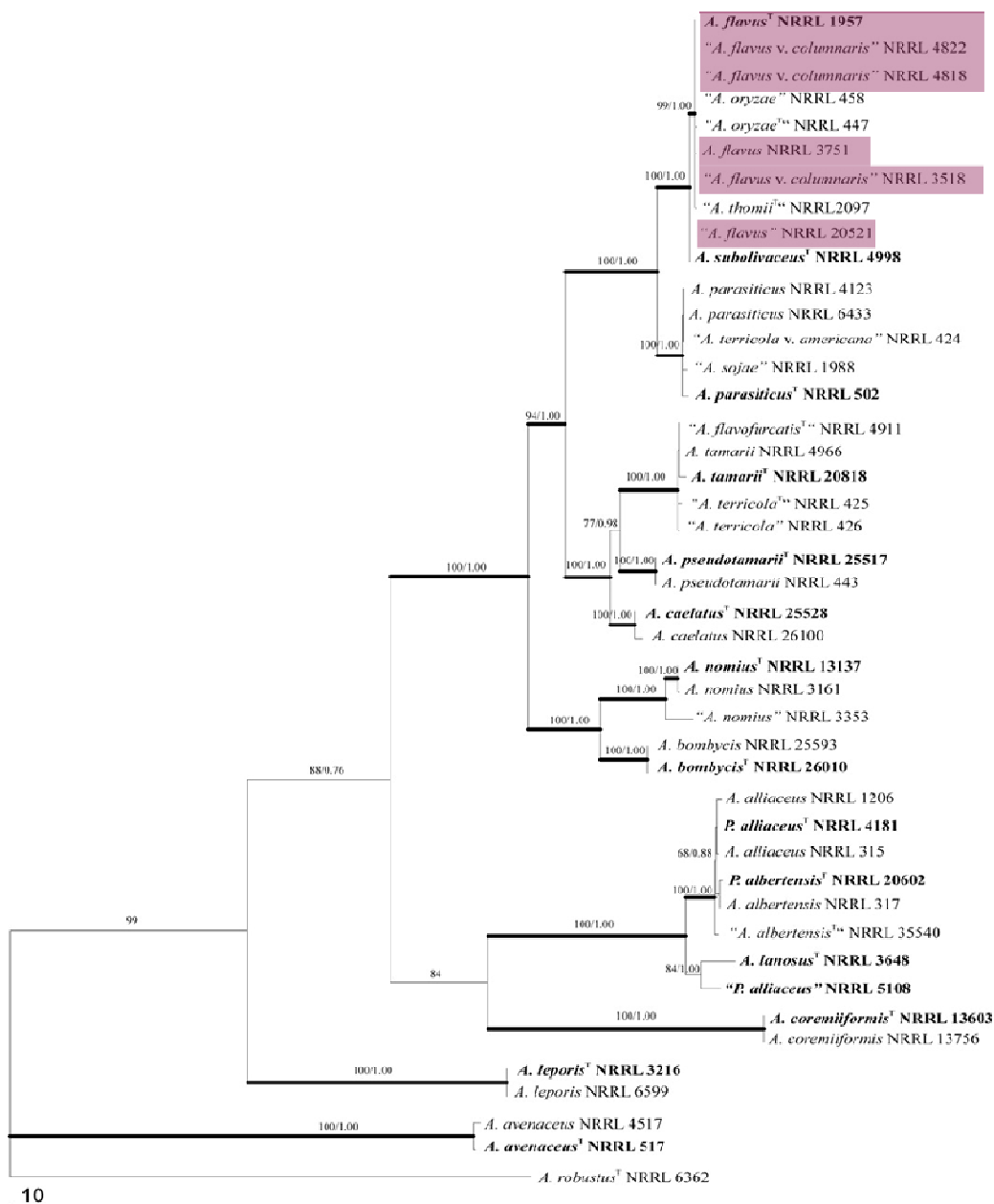




**Figura 1.7.** *A. ochraceus*. Cepa CECT 2948 cultivada en medio CYA durante 5 días.

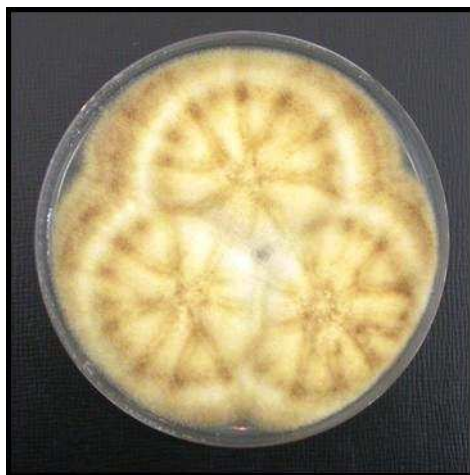
### 1.3. SECCIÓN *Flavi*

La sección *Flavi*, al contener dos especies de *Aspergillus* económicamente muy importantes (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*) ha recibido una atención considerable, llegando a ser uno de los grupos de hongos filamentosos mejor estudiados (Rokas *et al.*, 2007). Su taxonomía, como en los casos anteriores, ha ido modificándose a partir de la realización de análisis filogenéticos más amplios. En la Figura 1.8 se representa el dendrograma consenso obtenido por Peterson (2008), mediante el análisis de diferentes secuencias. Recientemente, se han propuesto dos nuevas especies en la sección: *A. minisclerotigenes* y *A. arachidicola* (Pildain *et al.*, 2008).



**Figura 1.8.** Árbol filogenético de la sección *Flavi* basado en las secuencias de la  $\beta$ -tubulina, calmodulina, ITS y RNA polimerasa II (Peterson, 2008). Se destaca en color la especie objeto de este estudio.

*A. flavus* se describe, macroscópicamente, como un hongo aterciopelado, de color amarillo a verde o marrón, con reverso dorado a rojo-marrón (Figura 1.9) (Hedayati *et al.*, 2007). *A. flavus* es el responsable del inicio de la micotoxicología moderna por la producción de unos potentes carcinógenos, las aflatoxinas (ver Apartado 4 de "Introducción"). Más recientemente, ha sido descrito como la segunda causa de aspergilosis en pacientes inmunodeprimidos (Hedayati *et al.*, 2007; Rokas *et al.*, 2007).



**Figura 1.9.** *A. flavus*. Cepa ITEM 4592 cultivada en medio CYA durante 5 días.

*A. oryzae*, por otra parte y como ya se ha indicado previamente, ha sido utilizado desde antiguo en la industria japonesa para la elaboración de alimentos tradicionales. La reciente secuenciación de ambos genomas, aún no publicada para *A. flavus*, indica que ambas especies son casi idénticas genéticamente (Hedayati *et al.*, 2007), por lo que se ha sugerido que *A. oryzae* podría ser un ecotipo "domesticado" de *A. flavus*, sin capacidad para producir aflatoxinas (Rokas *et al.*, 2007).

## 2. MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales y personas (Pitt, 1996). Se denomina "micotoxicosis" a la respuesta tóxica causada por las micotoxinas en el hombre y los animales.

Las micotoxicosis han sido descritas desde antiguo, llegando incluso a ser consideradas por algunos investigadores como la causa de la última de las Diez Plagas de Egipto (Marr y Malloy, 1996). El primer caso documentado de micotoxicosis data de la Edad Media en Europa, denominando a la enfermedad causada "Fuego de San Antonio". Se trataba del ergotismo, atribuido al consumo de alimentos preparados con cereales contaminados con alcaloides ergóticos, producidos por el hongo *Claviceps purpurea* o cornezuelo del centeno.

Las víctimas del ergotismo estaban expuestas a la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), sustancia alucinógena que provocaba en las personas afectadas delirios, convulsiones, alucinaciones, gangrena en las extremidades y una intensa sensación de quemazón (Bove, 1970; Beardall y Miller, 1994). Así mismo, los alcaloides ergóticos estuvieron muy probablemente involucrados en los fenómenos de "brujería" que condujeron a los juicios de Salem (Massachusetts, EEUU) en 1692, según algunos historiadores (Richard, 2007).

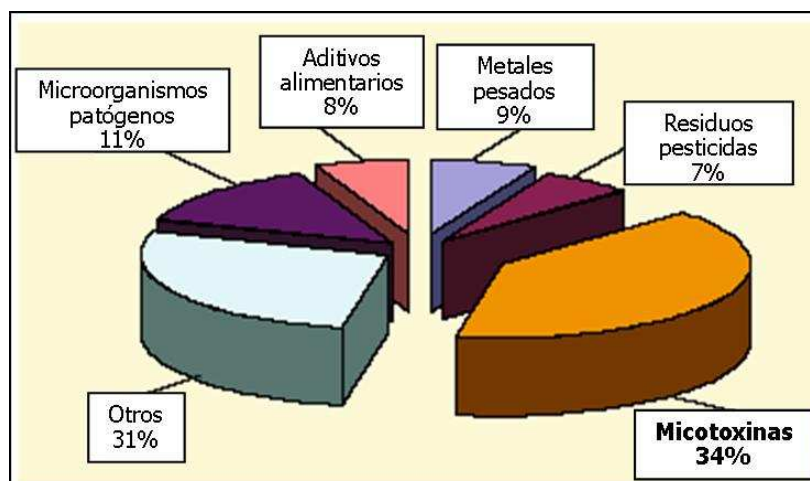
Durante finales del siglo XIX, se empezó a conocer la capacidad de los hongos de llevar a cabo fermentaciones y los investigadores empezaron a percibir la existencia de numerosos "metabolitos tóxicos" producidos por éstos, tanto en estado sólido como en fermentaciones líquidas. En el siglo XX, la producción de toxinas de *Fusarium* y *Stachybotrys* en cereales almacenados durante el invierno ocasionó también en Siberia y Rusia la muerte de miles de personas y animales, durante la Segunda Guerra Mundial, y diezmó pueblos enteros debido a una micotoxicosis, conocida después como "Aleucia Tóxica Alimentaria" (ATA) (Nesterov, 1951). Sin embargo, la micotoxicología moderna no comenzaría hasta el año 1963 con el descubrimiento de las aflatoxinas y sus propiedades (Asao *et al.*, 1963).

Debido a su diversidad química, las micotoxinas pueden disolverse en las fases lipídicas (fundamentalmente) o acuosas de los alimentos, y difundir al interior de ellos (Pitt, 2000). En consecuencia, estas toxinas pueden ser encontradas principalmente en cereales, semillas, frutas, y alimentos elaborados en base a estas materias primas, y se han relacionado con diversas enfermedades tanto en el ser humano como en animales. La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, causando efectos nocivos en el sistema nervioso central, los sistemas cardiovascular y pulmonar y el tracto digestivo (riñones e hígado). Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores. La capacidad de algunas micotoxinas de comprometer la respuesta inmune y, por tanto, reducir la resistencia a enfermedades infecciosas, está considerada hoy en día como uno de los efectos más importantes de estos metabolitos, particularmente en países desarrollados.

La presencia de micotoxinas en niveles muy superiores a los tolerables representa un riesgo importante en seguridad alimentaria. No obstante, la posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o zearalenona) en bajas dosis suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda (Galan y Rodríguez, 2003). En la actualidad, raramente se registran casos de micotoxicosis agudas en humanos por el consumo de alimentos contaminados con niveles altos de micotoxinas, encontrándose casos fundamentalmente en algunos países en vías de desarrollo. El Comité Mixto FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado, en diferentes sesiones, los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, considerando que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos de origen microbiológico. Sin embargo, el riesgo se incrementa, según el organismo de Naciones Unidas, cuando se habla de efectos crónicos (OMS, 2002).

La introducción de la Ley General de Alimentos en 2002 (Parlamento Europeo, 2002) fue un paso importante en la evolución hacia el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Semillas (RASFF: "Rapid Alert System for Food and Feed"), tal y como existe en la actualidad. El sistema implica un intercambio rápido de información entre las autoridades competentes de los estados miembros de la Unión Europea y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA: "European Food Safety Authority"), siendo ésta última independiente de la Comisión Europea, y creada en 2002 (Parlamento Europeo, 2002) para, entre otras tareas, desarrollar valoraciones de riesgos en el suministro de alimentos y semillas.

En los informes anuales que elabora el RASFF desde 2002, las micotoxinas suponen siempre la categoría de riesgo con mayor número de notificaciones, en torno a un 40% del total. Así, por ejemplo, en su último informe, se produjeron un total de 2014 notificaciones, de las cuales 679 estaban relacionadas con riesgos por micotoxinas, lo que representa el más elevado porcentaje, como puede apreciarse en la Figura 1.10 (RASFF, 2007).



**Figura 1.10.** Notificaciones alimentarias distribuidas a miembros de RASFF en 2007 (RASFF, 2007).

Las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que conllevan sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Se ha estimado que hasta un 25% de los cultivos alimentarios mundiales están contaminados con micotoxinas (OMS, 1999). En los países en desarrollo, donde los alimentos básicos (como el maíz y el maní) son susceptibles de contaminación, la población se ve afectada de forma significativa por la morbilidad y las muertes prematuras relacionadas con las micotoxinas (Wagacha y Muthomi, 2008).

Aunque existen muchos tipos de micotoxinas, en la Tabla 1.1 se pueden apreciar algunas de las principales, en cuanto a presencia en productos alimenticios y toxicidad para los seres vivos. También se incluyen los hongos productores, los alimentos principales que contaminan y sus efectos tóxicos más representativos.

MICOTOXINA	HONGO	SUSTRATO PRINCIPAL	PRINCIPALES EFECTOS TÓXICOS
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> sp.	Cereales, leche, frutos secos	Altamente cancerígena, produce toxicidad y cáncer de hígado
Citrinina	<i>Penicillium</i> sp.	Cereales y frutas	Efecto nefrotóxico, inmunosupresora
Fumonisin	<i>Fusarium</i> sp. <i>A. niger</i>	Cereales (maíz)	Carcinógena, hepatotóxica
Ocratoxinas	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	Cereales, café, legumbres, quesos, carnes ahumadas, frutas	Efecto nefrotóxico, necrosis hepática, efecto inmunosupresor
Patulina	<i>Penicillium</i> sp.	Cereales, frutas, quesos	Neurotóxica, afecciones pulmonares, lesiones de hígado y riñón, carcinomas, inmunosupresora.
Tricotecenos (T2, NIV, DON)	<i>Fusarium</i> sp.	Cereales	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, nervioso y piel.
Zearalenona	<i>Fusarium</i> sp.	Cereales y subproductos	Afecciones sistema reproductor, estrógena.

**Tabla 1.1.** Principales micotoxinas, hongos productores, alimentos principales que contaminan y efectos tóxicos más representativos. NIV: Nivalenol, DON: Deoxinivalenol, T2: Toxina T2.

Como se puede apreciar en la Tabla 1.1, los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* contienen básicamente las principales especies y cepas productoras de micotoxinas. Este trabajo se centra en una de las principales toxinas producidas por *Aspergillus*: la ocratoxina A. A ella nos referiremos con más detalle y amplitud.

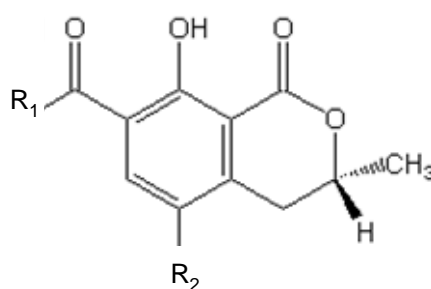
## 3. OCRATOXINA A

### 3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS OCRATOXINAS

Las ocratoxinas son pentaquétidos cíclicos que contienen una porción de isocumarín, normalmente ligado a una L-fenilalanina a través de un grupo carboxilo, mediante un enlace amida (EFSA, 2006). Existen 5 tipos de ocratoxinas, sin embargo la más tóxica es la ocratoxina A (OTA). En la estructura de esta toxina, la porción de isocumarín está clorado y ligado a una L-fenilalanina (EFSA, 2006). La ocratoxina B (OTB) es el derivado no clorado de la OTA, y es significativamente menos tóxica tanto *in vivo* como *in vitro* (Mally *et al.*, 2005). La ocratoxina C (OTC) es el éster de la OTA, y su posible potencial tóxico, aunque se considera prácticamente nulo, se ha descrito

específicamente sobre algunas líneas celulares de monocitos en el ser humano (O'Brien y Dietrich, 2005).

La ocratoxina  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) y la ocratoxina  $\beta$  (OT $\beta$ ) son productos de la hidrólisis de la OTA y OTB respectivamente, no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran tóxicas (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; O'Brien y Dietrich, 2005). La OT $\alpha$  se ha detectado en la orina de animales de experimentación a los que se les ha administrado OTA (Storen *et al.*, 1982). En animales rumiantes se ha observado un proceso de detoxificación de la OTA ingerida a OT $\alpha$  llevada a cabo en el rumen (Sreemannarayana *et al.*, 1988). En la Figura 1.11 se muestra la estructura química de las diferentes ocratoxinas.



TIPO DE OCRATOXINA	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ocratoxina A	Fenilalanina	Cl
Ocratoxina B	Fenilalanina	H
Ocratoxina C	Fenilalanina, etil éster	Cl
Ocratoxina $\alpha$	OH	Cl
Ocratoxina $\beta$	OH	H

**Figura 1.11.** Estructura química de las diferentes ocratoxinas.

La OTA está estructuralmente relacionada con la citrinina (Kuiper-Goodman y Scott, 1989), otra importante micotoxina que puede aparecer junto con la OTA, como se ha descrito en *Penicillium verrucosum* (Pitt y Hocking, 1997).



### 3.2. HONGOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A

La OTA fue aislada por primera vez en el año 1965 en Sudáfrica a partir de un cultivo de *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Desde entonces, la producción de esa micotoxina se ha asociado a distintas especies pertenecientes también a la sección *Circumdati* (IARC, 1993; Varga *et al.*, 1996; Frisvad *et al.*, 2004a). La proporción de cepas de *A. ochraceus* productoras de OTA se considera en general elevada, aunque los porcentajes varían según los autores: desde el 100% a porcentajes menores del 10% (Pitt y Hocking, 1997; Abarca *et al.*, 2001; Urbano *et al.*, 2001; Accensi *et al.*, 2004).

La sección *Nigri* ha adquirido una gran importancia como productora de OTA desde la primera descripción de la producción de esta micotoxina por *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994), por *A. carbonarius* (Horie, 1995), y por *A. tubingensis* (Medina *et al.*, 2005). Sin embargo, existe una gran diferencia entre los porcentajes de cepas ocratoxígenas en cada caso, siendo cercano al 100% en *A. carbonarius* y variando entre el 0,6 y el 50% en el agregado *A. niger* (Cabañes *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2004; Leong *et al.*, 2004; Sage *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2007; El Khoury *et al.*, 2008; Visconti *et al.*, 2008). Algunos autores han señalado a su vez la capacidad de las especies uniseriadas (*A. japonicus*/*A. aculeatus*) de producir OTA (Dalcero *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003b; Magnoli *et al.*, 2004), aunque este hecho no está totalmente aceptado, ya que en general no se consideran especies productoras (Visconti *et al.*, 2008).

Esporádicamente, también se ha descrito la producción de OTA por especies de *Aspergillus* no pertenecientes a las secciones *Circumdati* o *Nigri*, como *A. albertensis* (Varga *et al.*, 1996) *A. fumigatus* o *A. terreus* (Riba *et al.*, 2008).

Dentro del género *Penicillium*, la producción de OTA se detectó inicialmente en *Penicillium viridicatum* (Van Walbeek *et al.*, 1969) y posteriormente en otras especies, si bien en algunos casos se trataba de cepas erróneamente identificadas. La revisión de la identificación de cepas ocratoxígenas de *P. viridicatum* permitió detectar que, en realidad, se trataba de cepas de *P. verrucosum* (Ciegler, 1973; Pitt, 1987). Actualmente, *P. verrucosum* se ha dividido en dos especies ocratoxígenas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Castellá *et al.*, 2002; Frisvad y Samson, 2004; Bragulat *et al.*, 2008).

### 3.3. FACTORES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y SU PRESENCIA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS

La distribución de las especies productoras de OTA mencionadas, y la propia producción de la toxina, están influidas por factores climáticos, por el hospedador y por las condiciones ambientales. En general, la disponibilidad de agua ( $a_w$ ) y la temperatura se consideran los principales factores que inciden no sólo en la proliferación de hongos ocratoxígenos, sino también en la producción de OTA (Varga *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1998; Bellí *et al.*, 2003; Esteban *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Así mismo, parecen tener una influencia significativa el pH del medio (Esteban *et al.*, 2005), el sustrato de crecimiento o la composición del medio (Atoui *et al.*, 2007b), la presencia de metales traza y las fuentes de carbono existentes (Mühlencoert *et al.*, 2004).

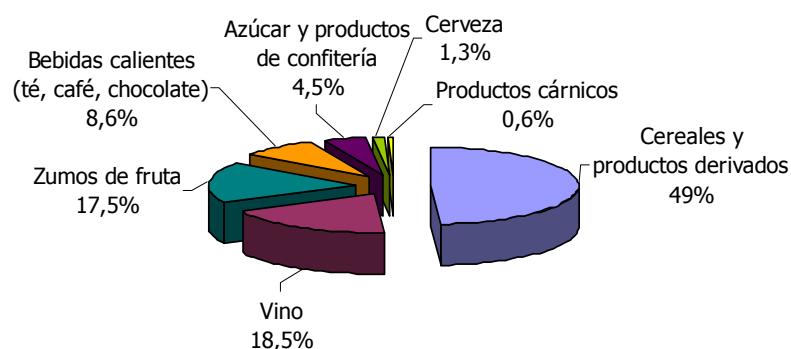
La producción óptima de OTA por *A. ochraceus* se ha descrito entre 20 y 30°C, mientras que *P. verrucosum* produce OTA a temperaturas inferiores, entre 10 y 20°C (Magan, 2006; Pardo *et al.*, 2006). Por ello, generalmente se había considerado que *P. verrucosum* era el responsable de la producción de OTA en zonas frías, mientras que la contaminación por OTA en zonas más cálidas se atribuía únicamente a *A. ochraceus* (Pitt y Hocking, 1997). Sin embargo, desde la detección de la capacidad ocratoxígena de las especies incluidas en la sección *Nigri*, se ha descrito que éstas tienen un papel importante en la contaminación por OTA de climas cálidos, ya que *A. carbonarius* presenta su máximo crecimiento a temperaturas de 25-30°C (Leong *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2004; Bellí *et al.* 2006c; Romero *et al.*, 2007), con una producción de OTA óptima a temperaturas de 15-20°C (Esteban *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006; Valero *et al.*, 2006a), mientras que las especies del agregado *A. niger* presentan tanto el crecimiento como la producción de OTA óptimos a 20-25°C (Esteban *et al.*, 2004).

De acuerdo con la amplia distribución de los hongos productores de OTA, ésta es una toxina que presenta una distribución mundial, y asociada a múltiples sustratos. Puede encontrarse como contaminante natural en los cereales y subproductos de cereales, incluyendo maíz, cebada, trigo, sorgo, centeno, avena y arroz (Beretta *et al.*, 2002; Baliukoniene *et al.*, 2003; Halstensen *et al.*, 2004; Ayalew *et al.*, 2006; Hajjaji *et al.*, 2006; Sugita-Konishi *et al.*, 2006; Lattanzio *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007; Roscoe

*et al.*, 2008), leguminosas (Van Egmond y Speijers, 1994; Pittet, 1998; Domijan *et al.*, 2005), en productos cárnicos de cerdo y aves (Canela *et al.*, 1994; Gareis y Scheuer, 2000; Curtui *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2001; Petzinger y Weidenbach, 2002; Jorgensen, 2005), y, en menor cantidad, en leche de vaca y derivados (Skaug, 1999; Boudra *et al.*, 2007; Fink-Gremmels, 2008). La presencia de OTA en estos animales se detecta tras el consumo de piensos que contienen la micotoxina (Holmberg *et al.*, 1991; Gareis y Wolff, 2000; Fink-Gremmels, 2008).

En los últimos años ha adquirido una gran importancia la presencia de OTA en otro tipo de sustratos, como los frutos secos, las especias, el vino, el café, la cerveza y otros alimentos (Varga *et al.*, 2001; Petzinger y Weidenbach, 2002; Papachristou y Markaki, 2004; Jorgensen, 2005; Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Sugita-Konishi *et al.*, 2006; Napolitano *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2008).

Debido a su gran importancia en la dieta humana, los principales contribuyentes al consumo de OTA son los cereales y sus productos derivados, llegando a constituir hasta un 70% de la OTA consumida en la dieta (Leblanc *et al.*, 2005). En menor medida se encuentran el café, la cerveza, el vino, los productos cárnicos, las legumbres y las especias (Wolff *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2001; Leblanc *et al.*, 2005). En la Figura 1.12 se muestra la contribución media de diferentes alimentos a la ingesta diaria de OTA, calculado a partir de estudios realizados en tres países de la Unión Europea: Francia Italia y Suecia (EFSA, 2006). Dicha contribución se estimó tomando en cuenta tanto las concentraciones medias de OTA en cada categoría alimentaria, como el nivel de consumo medio de cada tipo de alimento.



**Figura 1.12.** Contribución media de diferentes alimentos a la ingesta diaria de OTA. (EFSA, 2006).

Como se puede apreciar en la Figura 1.12, los dos principales grupos de alimentos que contribuyen en mayor medida al aporte medio diario de OTA son los cereales, sus productos derivados, y el vino. Ambas materias primas de estos productos alimentarios (cereales y uvas) constituyen las dos matrices alimentarias objeto de este estudio. En el caso de los cereales, tanto en grano como en productos derivados, la presencia de OTA se empezó a describir a finales de la década de los 60 (Kuiper-Goodman y Scott, 1989; Bayman y Baker, 2006), por lo que su importancia en el aporte de OTA en la dieta era evidente casi desde el descubrimiento de la propia toxina. En cambio, la uva fue considerada un producto libre de micotoxinas hasta 1996, año en que se detectó OTA por primera vez durante un estudio llevado a cabo en Suiza con muestras de vino de diferentes orígenes geográficos (Zimmerli y Dick, 1996). Su papel en el aporte de OTA fue comprobado posteriormente, por lo que la detección y control de esta micotoxina en uvas y productos derivados ha ido adquiriendo una mayor relevancia.

### 3.4. TOXICOLOGÍA

En animales de explotaciones ganaderas se han notificado casos de ocratoxicosis en varios países, y la manifestación primaria en todos los casos fue la nefropatía crónica (Huff, 1991). Bajo condiciones experimentales, se ha comprobado que la OTA es nefrotóxica en todas las especies de animales estudiadas hasta el momento, incluyendo a roedores, cerdos, pájaros y pequeños rumiantes, e incluso a muy bajas concentraciones (Walker y Larsen, 2005). La mayoría de los informes sobre nefropatía inducida por OTA fueron obtenidos en estudios experimentales con cerdos, en los que se describieron cambios tanto estructurales como funcionales (Stoev *et al.*, 2002; Aukema *et al.*, 2004; Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007). Así mismo, en cerdos y otros animales (roedores, conejos), se produjeron trastornos en el hígado, dando lugar a una acumulación de glucógeno en los tejidos hepático y muscular, se inhibió la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Verma y Chakraborty, 2008), y se comprobaron efectos neurotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores (JECFA, 2001; Follmann y Lucas, 2003; Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007).

Basándose en estudios de carcinogénesis realizados con ratas y ratones, en los que la administración crónica de OTA provocó cáncer hepático y renal (Bendele *et al.*, 1985; National Toxicology Program, 1989), fueron clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como un posible carcinógeno para el ser humano (del grupo 2B) (IARC, 1993).

En humanos, la exposición a OTA se ha asociado con la Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN), una afección renal de etiología desconocida, que hasta ahora sólo se ha observado en algunas partes de la Península Balcánica. La BEN es una enfermedad crónica, de evolución lenta, y que finalmente causa la muerte por fallo renal (Stefanovic *et al.*, 2006). En las zonas de la Península Balcánica donde prevalece la enfermedad se ha observado una elevada concentración de OTA en alimentos habituales en la dieta (Fink-Gremmels, 2005; Castegnaro *et al.*, 2006), y también se han detectado niveles elevados de la toxina en sangre y orina, considerados como biomarcadores de exposición (Hult *et al.*, 1982; Castegnaro *et al.*, 1990). Las lesiones renales en esta enfermedad son comparables a las advertidas en la nefropatía porcina vinculada con la OTA (Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007). Otras patologías asociadas con la OTA son los Tumores del Tracto Urinario (UTT), descritos también con mayor incidencia en las áreas endémicas para BEN (Fink-Gremmels, 2005), y la Nefropatía Crónica Intersticial (en el Norte de África) (Bayman y Baker, 2006).

Aunque el mecanismo de acción de la OTA es desconocido, la inhibición de la síntesis de proteínas se ha definido como el mecanismo de toxicidad primario (Assaf *et al.*, 2004; Bayman y Baker, 2006). Por otra parte, según la EFSA, recientes evidencias científicas indican que la toxicidad renal, así como el daño genotóxico, medidos en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden ser atribuidos a daño celular oxidativo causado por la toxina (EFSA, 2006).

### 3.5. LEGISLACIÓN ACTUAL

Hasta finales de la década de los 90, las regulaciones para micotoxinas eran, en su mayoría, legislaciones a nivel nacional (Van Egmond *et al.*, 2007). Gradualmente, dichas regulaciones se han ido unificando y armonizando para países miembros tanto de la Unión Europea como de otras comunidades económicas, y el número de países

que se unían a estas regulaciones conjuntas ha ido en aumento. Así, por ejemplo, en 2003, aproximadamente 100 países poseían regulaciones para micotoxinas en productos alimentarios, un aumento de un 30% comparado con el año 1995 (Van Egmond *et al.*, 2007).

En el caso de regulaciones para OTA, la actividad coordinada en Europa se inició en 1995, año en el que se elaboró el primer estudio conjunto realizado para establecer el nivel de ingesta de OTA por la población de los Estados Miembros de la Unión Europea (Comisión Europea, 1997), y que dio lugar a la elaboración de la primera legislación comunitaria para esta toxina en alimentos (Comisión Europea, 1998). Desde ese momento, tanto los estudios de toxicidad como los de incidencia de OTA en Europa se han incrementado en gran medida (Wolff *et al.*, 2000; Jørgensen, 2005; Leblanc *et al.*, 2005), y los límites máximos permitidos de OTA en distintos alimentos han ido disminuyendo.

El último reglamento propuesto por la Unión Europea para contenidos máximos de OTA permitidos en productos alimentarios ha sido publicado en 2006 (Comisión Europea, 2006), y se muestra en la Tabla 1.2. En la actualidad, se ha establecido una ingesta semanal tolerable de OTA de 120 ng/kg de peso corporal (EFSA, 2006).

PRODUCTO ALIMENTICIO	LÍMITE OTA (µg/kg)
<b>Cereales:</b>	
- Cereales no elaborados	5
- Productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo	3
<b>Uvas pasas</b> (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10
<b>Café:</b>	
- Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5
- Café soluble (café instantáneo)	10
<b>Vino:</b>	
- Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol.) y vino de frutas.	2
- Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas.	2
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo.	2
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,5

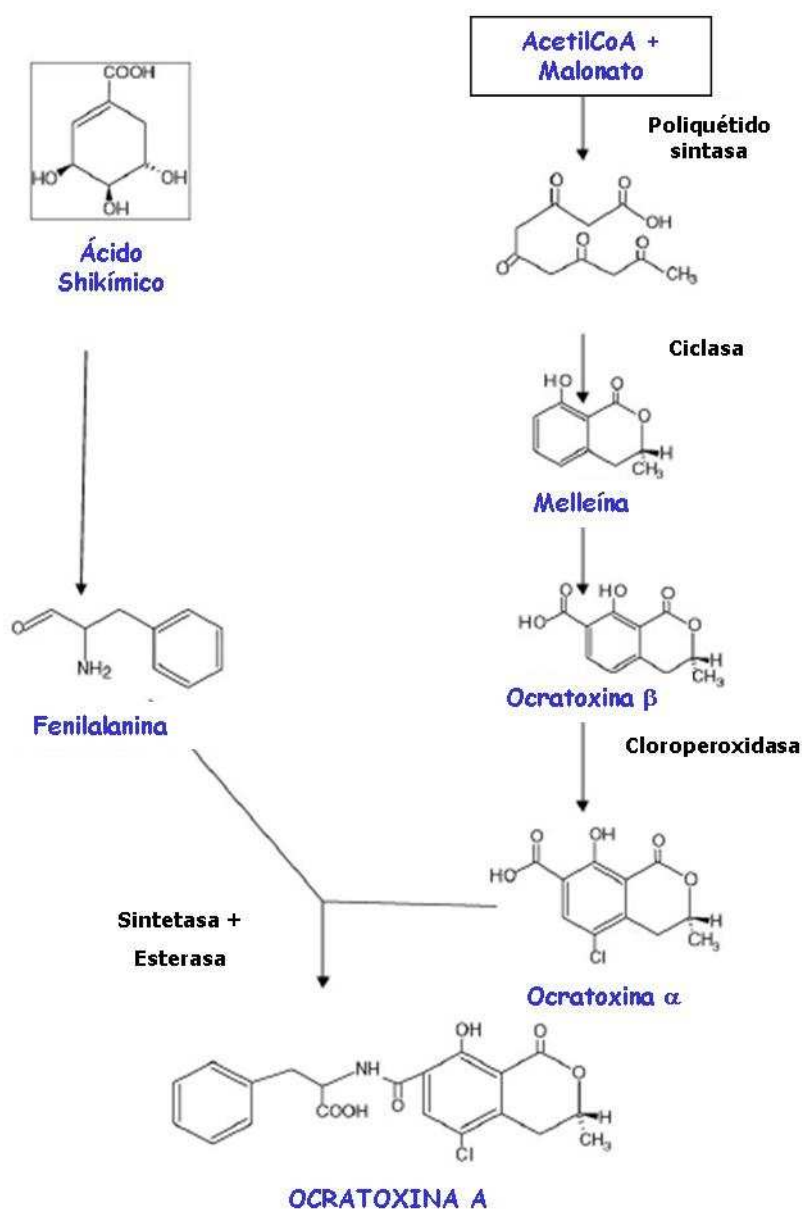
PRODUCTO ALIMENTICIO	LÍMITE OTA (µg/kg)
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales y dirigidos específicamente a los lactantes	0,5
Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos, especias y regaliz	-

**Tabla 1.2.** Contenido máximo de OTA tolerado en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea (Comisión Europea, 2006).

Como se puede comprobar en la Tabla 1.2, la legislación europea está dirigida, en especial, al control de OTA en tres productos: cereales y productos derivados, uvas y productos derivados (vinos, uvas pasas, zumos de uva...), y café. Nuevamente, se destaca la importancia del control de los niveles de OTA en alimentos elaborados en base a cereales y uvas, debido a su importancia en el aporte de OTA en la dieta (ver Figura 1.12).

### 3.6. BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A

La ruta biosintética de OTA propuesta por Huff y Hamilton en 1979, basada en algunos artículos publicados previamente, postula tres distintas etapas en la biosíntesis de OTA. La primera corresponde a la síntesis de un residuo poliquétido de ocratoxina  $\alpha$  a partir de acetilCoA y malonato. En un primer paso, una enzima poliquétido sintasa inicia la síntesis del residuo poliquétido a través de la vía del acetato-malonato, dando lugar a melleína como intermediario (Steyn *et al.*, 1970). A continuación, la melleína es metilada y oxidada, dando lugar a ocratoxina  $\beta$ , y una molécula de cloro es incorporada directamente para dar lugar a ocratoxina  $\alpha$  (Wei *et al.*, 1971). En la segunda etapa se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de ácido shikímico, que se une a su vez a la ocratoxina  $\alpha$  (Ferreira y Pitout, 1969). Por último, en la tercera etapa, una enzima sintetasa genera ocratoxina C, y una esterasa conduce finalmente a la formación de OTA (Figura 1.13)



**Figura 1.13.** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de OTA propuesta por Huff y Hamilton (1979).

En la actualidad, se sabe que los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y otros metabolitos secundarios están frecuentemente organizados formando agrupaciones de genes o *clusters*. Éste es el caso de los genes de biosíntesis de aflatoxinas, esterigmatocistina, tricotecenos y fumonisinas, en los que se incluyen genes responsables de la propia síntesis, de la regulación de la ruta, del transporte del producto sintetizado y de la autoprotección del hongo frente al propio metabolito



(Brown *et al.*, 1996; Hohn *et al.*, 1998; Proctor *et al.*, 2003; Ehrlich *et al.*, 2005; Shwab y Keller, 2008).

La organización en un *cluster* de los genes de la ruta biosintética de OTA fue puesta de manifiesto por primera vez mediante la clonación de una secuencia que contenía tres genes adyacentes, implicados en la biosíntesis de OTA en *P. nordicum* (Karolewicz y Geisen, 2005). Los tres genes correspondían a una proteína poliquétido sintasa (gen *otapksPM*), a una proteína sintetasa de péptidos no ribosomales (gen *npsPM*) y a una alcalin-serín proteinasa (gen *aspPM*). En la actualidad, la obtención de las secuencias flanqueantes del *cluster* a partir de este fragmento se está llevando a cabo, y según los autores, se publicará próximamente (Schmidt-Heydt y Geisen, 2007). Las secuencias génicas obtenidas han sido utilizadas para la detección mediante PCR de cepas y especies de *Penicillium* productoras de OTA (Bogs *et al.*, 2006; Schmidt-Heydt y Geisen, 2007). Recientemente, se ha identificado la poliquétido sintasa implicada en la síntesis de OTA en *P. verrucosum* (gen *otapksPV*) (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007).

La ruta de biosíntesis de OTA en especies de *Aspergillus* es, por el contrario, muy poco conocida (O'Callaghan y Dobson, 2006), y solamente se ha identificado un gen codificador de una proteína poliquétido sintasa PKS, implicado con seguridad en la biosíntesis de OTA en la especie *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003). Posteriormente, han sido descritos dos genes más, pertenecientes a la superfamilia de citocromos P450, con elevada similitud a genes P450 fúngicos implicados en la ruta de biosíntesis de otras micotoxinas, y cuyos niveles de expresión se correlacionaban positivamente con la producción de OTA, en particular en uno de ellos (*p450-B03*) (O'Callaghan *et al.*, 2006). Sin embargo, su organización en un *cluster* no estaba confirmada.

El conocimiento de los genes implicados en la biosíntesis de OTA en las diferentes especies productoras es importante, debido a que uno de los objetivos principales de las técnicas de detección de especies mediante PCR es la diferenciación entre cepas tóxicas y no tóxicas, para su diagnóstico en productos alimentarios (Frisvad *et al.*, 2007; Schmidt-Heydt y Geisen, 2007). Una completa identificación de los *clusters* responsables de la producción de OTA en las distintas especies mostrará si todos los aislamientos de las especies descritas como productoras realmente poseen los genes requeridos (Frisvad *et al.*, 2007).

Tanto proteínas P450 como poliquétido sintetas intervienen en la síntesis de varias micotoxinas, incluida la síntesis de OTA, y por ello se describen a continuación algunos de sus aspectos más relevantes.

### 3.6.1. Superfamilia citocromo P450

Los genes P450, denominados *cyp*, codifican una superfamilia de proteínas citocromo P450 con secuencias aminoacídicas extremadamente diversas, y niveles de identidad tan bajos como del 16% en algunos casos, si bien sus motivos estructurales esenciales se han conservado a lo largo de la evolución (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Las P450 son proteínas hemo-tiolato, por lo que sus dominios más conservados pertenecen a la región de la proteína que rodea al grupo hemo, en especial la cisteína que sirve como quinto ligando al átomo de hierro del grupo hemo (Ehrlich *et al.*, 2004). La alta conservación de la región de unión hemo, que se corresponde con el centro catalítico de la enzima, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones y de activación de oxígeno (Williams *et al.*, 2000).

Las proteínas citocromo P450 constituyen una de las mayores superfamilias de hemoproteínas, y se encuentran en casi todos los seres vivos procariotas o eucariotas, aunque su abundancia es considerable en plantas (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Se denominan de esta manera por la absorción a 450 nm del complejo de monóxido de carbono con el hierro ferroso unido a la cisteína (en el resto de hemoproteínas, en las que la histidina actúa como ligando, el máximo de absorción aparece a 420 nm). Las enzimas P450 intervienen tanto en el metabolismo de compuestos xenobióticos como en la biosíntesis de metabolitos secundarios, por ejemplo micotoxinas (Van den Brink *et al.*, 1998; Donato y Castell, 2003).

Los citocromos P450 pueden clasificarse en cuatro clases en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico del enzima (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Las enzimas de clase II únicamente necesitan una reductasa del citocromo P450 que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones, y son las más abundantes en eucariotas. Los P450 de este tipo están anclados de forma independiente en la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico mediante una región hidrofóbica del extremo amino-terminal (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Estas enzimas participan en múltiples funciones biosintéticas, siendo éstas

proteínas las que, en los hongos, se encargan de la síntesis de esteroides de membrana y micotoxinas (Donato y Castell, 2003).

Debido a su intervención en la síntesis de metabolitos, enzimas de citocromo P450 de clase II han sido identificadas, en todos los casos descritos, como parte de los *cluster* de las rutas de biosíntesis de micotoxinas secuenciadas hasta el momento. Así, por ejemplo, están implicadas en la ruta biosintética de aflatoxinas (Yu *et al.*, 1997; Ehrlich *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004a), tricotecenos (Hohn *et al.*, 1995) y fumonisinas (Seo *et al.*, 2001). Igualmente, se han identificado en la síntesis de esterigmatocistina (Brown *et al.*, 1996), micotoxina químicamente relacionada con las aflatoxinas y producida, entre otras especies, por *A. nidulans*, y paxilina (McMillan *et al.*, 2003), micotoxina sintetizada por *Penicillium paxii*.

No todos los genes de la ruta biosintética de una micotoxina correlacionan con su biosíntesis (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007). Aunque aún no está comprobado en las demás micotoxinas, existen trabajos que describen la relación positiva entre la expresión génica de codificadores de enzimas citocromo P450 y la producción de aflatoxinas (Sweeney *et al.*, 2000; Scherm *et al.*, 2005; Degola *et al.*, 2007).

### 3.6.2. Poliquétido sintasas

Los compuestos denominados poliquétidos forman un grupo de metabolitos secundarios estructuralmente diversos con un amplio rango de actividades biológicas (Staunton y Weissmann, 2001). Las enzimas que los sintetizan, llamadas poliquétido sintasas (PKS), son muy variables en estructura y son responsables de la biosíntesis de diversas micotoxinas y otros metabolitos secundarios. Las estructuras poliquétido son sintetizadas mediante la adición de sucesivos grupos acetatos para formar una cadena, lineal o aromática, de unidades de dos átomos de carbono con grupos cetónicos alternantes (Du *et al.*, 2008). Las PKS se clasifican en tres grupos principales. Las PKS de hongos pertenecen al tipo I, que engloban grandes proteínas multifuncionales con varios dominios (Fujii *et al.*, 2001).

Muchas micotoxinas tienen estructura de poliquétido, como por ejemplo la patulina, las aflatoxinas, las fumonisinas y las ocratoxinas, y, por tanto, la acción de las enzimas PKS constituye el primer paso para su formación (Atoui *et al.*, 2006). Así, se han identificado genes codificadores de poliquétido sintasas implicados en la síntesis de

fumonisin (Proctor *et al.*, 1999), aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2003) y OTA (O'Callaghan *et al.*, 2003; Karolewicz y Geisen, 2005).

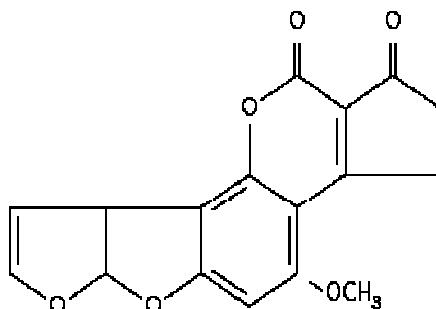
Se ha demostrado que los genes codificadores de enzimas PKS implicadas en la biosíntesis de toxinas se encuentran regulados a nivel transcripcional y no se expresan cuando la toxina no se produce. Éste es el caso del gen de producción de esterigmatocistina *stcA* de *A. nidulans* (Feng y Leonard, 1995), del gen de biosíntesis de aflatoxinas *pksL1* de *A. parasiticus* (Feng y Leonard, 1995), del gen *pks* de *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003) o del gen *fum1* de biosíntesis de fumonisin (Proctor *et al.*, 2003).

#### 4. AFLATOXINAS

Las aflatoxinas forman el grupo de micotoxinas mejor estudiado y el primero descrito (Asao *et al.*, 1963) y son sintetizadas fundamentalmente por las especies de la sección *Flavi* *A. flavus* y *A. parasiticus* (Bennett y Papa, 1988; Payne y Brown, 1998; Abbas, 2005), aunque también se han descrito como productoras otras especies del género *Aspergillus* de otras secciones, de menor importancia en cuanto a niveles de producción (Cary y Ehrlich, 2006) y presencia en productos agroalimentarios (Cary y Ehrlich, 2006; Horn, 2007). Éste es el caso de las especies *A. toxicarius*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii* (Hedayati *et al.*, 2007) y *A. parvisclerotigenus* (Frisvad *et al.*, 2004b) en la sección *Flavi*, *A. ochraceoroseus* (Klich *et al.*, 2000) y *A. rambellii* (Frisvad *et al.*, 2005) en la sección *Ochraceorosei*, y *Emericella astellata* (Frisvad *et al.*, 2004b; Cary *et al.*, 2005) y *E. venezuelensis* (Frisvad *et al.*, 2005; Cary *et al.*, 2005) en la sección *Nidulantes*. Recientemente, se han descrito dos nuevas especies de la sección *Flavi* (*A. minisclerotigenes* y *A. arachidicola*) también productoras de aflatoxinas (Pildain *et al.*, 2008).

Las aflatoxinas fueron inicialmente identificadas como causantes de la muerte repentina de unos cien mil pavos en el Reino Unido en 1960, en lo que se denominó "Enfermedad X de los Pavos" (Asao *et al.*, 1963). Estructuralmente, las aflatoxinas son derivados de la difuranocumarina, existiendo cuatro tipos naturales: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, de los cuales el B<sub>1</sub> es el más abundante y tóxico (Richard, 2007; Phillips *et al.*, 2008) (Figura 1.14).

Las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> son derivados monohidroxilados de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, respectivamente, y son excretadas en la leche de los animales que han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas (Sweeney y Dobson, 1999).



**Figura 1.14.** Estructura química de la aflatoxina B<sub>1</sub>.

Las aflatoxinas son inmunosupresoras y hepatotóxicas, y en el caso de intoxicaciones agudas pueden producir la muerte (Bennet y Klich, 2003). El caso más grave de intoxicación aguda descrito hasta el momento ocurrió en el año 2004 en Kenia, donde 215 personas fallecieron al ingerir maíz contaminado con esta micotoxina (MMWR, 2004; Muture y Ogana, 2005). La aflatoxina B<sub>1</sub> es el agente cancerígeno natural más potente que se conoce, asociada principalmente al cáncer hepático, por lo que está clasificada como carcinógeno del grupo 1A por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1982). Actualmente, la legislación Europea establece un límite máximo de 4 µg/kg de aflatoxinas totales en cereales y frutos secos (Comisión Europea, 2006).

Uno de los principales alimentos susceptibles de contaminación por hongos productores de aflatoxinas son los cereales (Pittet, 1988), además de cacahuetes, pistachos, nueces (Jelinek *et al.*, 1989), especias (Bartine y Tantaoui-Elaraki, 1997) e higos (Doster *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1997).

## 5. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS

En la identificación de las especies fúngicas mediante la taxonomía clásica se utilizan, casi exclusivamente, caracteres morfológicos (Hawksworth *et al.*, 1996). Estos métodos incluyen la necesidad de cultivar los hongos en diferentes medios, la observación de características externas macroscópicas (coloración y textura, diámetro de la colonia...) y de estructuras microscópicas (ornamentación y tamaño de los conidios, longitud y anchura de las métulas y fiálides...). Además, son laboriosos, requieren varias semanas para su observación y análisis, son difíciles de estandarizar y han de ser realizados por expertos en taxonomía (Zhao *et al.*, 2001). Por otra parte, no permiten la detección de variabilidad intraespecífica y la identificación de cepas concretas.

Por todo ello, el uso exclusivo de los métodos de identificación de hongos usados tradicionalmente ha sido cuestionado en los últimos años. En algunos casos se han utilizado otros parámetros como son los perfiles de metabolitos secundarios para diferenciar especies muy próximas. Estos caracteres siguen empleándose en la actualidad para *Aspergillus* por algunos autores (Parenicová *et al.*, 2001; Samson *et al.*, 2004; Frisvad *et al.*, 2007).

Por otro lado, los avances en las técnicas de análisis de DNA han conducido al desarrollo de nuevos métodos para la caracterización y diferenciación de cepas tanto de hongos filamentosos como de otros organismos. La principal ventaja de los métodos de identificación basados en el DNA sobre los métodos de identificación fenotípica es que no están influenciados por las condiciones ambientales (Ness *et al.*, 1993), y no dependen de la interpretación, a veces subjetiva, de características morfológicas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un salto cualitativo en el diagnóstico fúngico. Esta técnica es rápida, específica y fácil de realizar. Además, debido a su alta sensibilidad requiere muy poca cantidad de DNA molde, permitiendo detectar moléculas diana en mezclas complejas. Por ello, está siendo utilizada para la detección y en algunos casos cuantificación directa de especies micotoxígenas (Edwards *et al.*, 2002; Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2007).

La técnica de PCR ha constituido una alternativa muy importante a los antiguos procedimientos moleculares de identificación fúngica, como la electroforesis en gel de campo pulsante (Schwartz y Cantor, 1984), o a los métodos basados en hibridaciones de DNA, como el clásico "Southern Blot" (Southern, 1975; Van der Vossen y Hofstra, 1996) y el "DNA-fingerprinting" (Jeffrey *et al.*, 1985a y b; Lieckfeldt *et al.*, 1992).

Los distintos métodos basados en PCR comúnmente empleados para la identificación de hongos filamentosos incluyen los que se basan en polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción y de fragmentos amplificados (RFLPs y AFLPs, respectivamente), en DNA polimórfico amplificado al azar (RAPDs), y en la amplificación de fragmentos de genes como el Factor de Elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), la calmodulina, y regiones genómicas no codificantes del rDNA como el Espaciador Interno Transcrito (ITS). Además, para obtener dichas secuencias, variantes de la técnica de PCR permiten amplificar cDNA (RT-PCR) y realizarla a tiempo real, permitiendo la estimación de la cantidad inicial de DNA (o cDNA) presente en la muestra (PCR cuantitativa o a tiempo real). Cada una de estas técnicas, así como sus aplicaciones, se describe a continuación.

### 5.1. PCR-RFLPs

El polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, "Restriction Fragment Length Polymorphism") (Botstein *et al.*, 1980), es una de las primeras técnicas de diagnóstico de organismos descritas desde la invención de la PCR, y consiste en visualizar diferencias en la secuencia de DNA que afectan a las dianas de las enzimas de restricción. Los patrones producidos por las enzimas de restricción se obtienen de una sola región genómica, previamente amplificada con cebadores específicos. Dependiendo de la región amplificada, su tamaño o nivel de variabilidad se aplica para la diferenciación de cepas o linajes a nivel intraespecífico, o entre especies o géneros. En el caso de hongos filamentosos, se ha empleado, entre otros, para distinguir especies del género *Fusarium* (Mirete *et al.*, 2003) y, dentro del género *Aspergillus*, de la sección *Flavi* (Kumeda y Asao, 1996, Nikkuni *et al.*, 1998), *Circumdati* (Varga *et al.*, 2000b) o *Nigri* (Accensi *et al.*, 1999; Martínez-Culebras y Ramón, 2007).

## 5.2. RAPDs

En el ensayo de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, "Random Amplified Polimorphic DNA"), los patrones de DNA son generados por amplificación de segmentos de DNA al azar con cebadores cortos de secuencias de nucleótidos arbitrarias (Williams *et al.*, 1990). La aplicación de RAPDs permite distinguir a nivel de especies y en algunos casos de subespecies si existen pequeñas diferencias entre ellas. Aunque se ha utilizado en ocasiones para obtener patrones de hongos filamentosos (Lieckfeldt *et al.*, 1992; Sartori *et al.*, 2006), no ha podido ser aplicada para la detección de hongos en matrices alimentarias debido, principalmente, a su problema de reproducibilidad, y también su sensibilidad al DNA no diana (Edel *et al.*, 1997).

## 5.3. PCR-AFLPs

El polimorfismo para la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs, "Amplified Fragment Length Polymorphism") fue descrito por primera vez en 1995 por Vos y colaboradores (Vos *et al.*, 1995), y ha resultado ser una herramienta útil para la identificación de especies y subespecies de hongos filamentosos, como *Aspergillus* o *Fusarium* (Edel *et al.*, 1997; Bleas *et al.*, 1998; Savelkoul *et al.*, 1999; Chulze *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003; Perrone *et al.*, 2006). Las ventajas de esta técnica son los elevados niveles de polimorfismo que pueden detectar, su mayor reproducibilidad en comparación con la técnica de RAPDs, y el hecho de que puede ser fácilmente automatizada (Aarts y Keijer, 1999).

## 5.4. PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS

La detección de hongos productores de toxinas mediante PCR es rápida, sensible y específica, y puede estar basada en secuencias relacionadas o no con la toxina producida (González-Jaén *et al.*, 2004). La primera situación presupone el conocimiento de los genes implicados en su biosíntesis. Además, en cualquier caso, para el diseño de sistemas específicos de detección han de definirse oligonucleótidos que permitan distinguir cepas, especies o incluso géneros, dependiendo del nivel de detección que queramos considerar.



En este sentido, es importante elegir bien la secuencia de DNA diana que se va a amplificar en un primer momento mediante PCR, la cual puede ser de genes codificadores, como los genes de EF-1 $\alpha$ , la  $\beta$ -tubulina, la calmodulina o poliquétido sintasas (Perrone *et al.*, 2004; Dao *et al.*, 2005; Susca *et al.*, 2007a), o secuencias de regiones no codificadoras, como los espaciadores IGS e ITS, por ejemplo.

Una de las regiones más empleadas actualmente para la distinción entre especies de hongos filamentosos, y que se utiliza en este trabajo, es la del DNA ribosómico (rDNA). Los genes que codifican para rRNA en eucariotas están repetidos en tándem con varios cientos de copias por genoma. Cada copia consiste en regiones altamente conservadas, que incluyen los genes que codifican para las subunidades de rRNA 18S, 5,8S y 28S (White *et al.*, 1990), alternadas con regiones espaciadoras variables (ITS e IGS).

Los espaciadores ITS ("Internal Transcribed Spacer") consisten en dos regiones variables no codificantes llamadas ITS1 e ITS2, que están localizadas entre los genes del rRNA 18S y 5,8S y entre el 5,8S y 28S respectivamente. La región IGS ("Intergenic Spacer Region") separa las unidades 18S y 28S del rDNA y no se transcribe, mientras que las regiones ITS sí lo hacen. La Figura 1.15 muestra un esquema de los genes que codifican para rRNA en eucariotas y sus correspondientes regiones espaciadoras.



**Figura 1.15.** Esquema de los genes que codifican para rRNA en eucariotas y sus regiones espaciadoras ITS e IGS.

La elección del rDNA para realizar estudios filogenéticos se debe a que se encuentra presente en todos los seres vivos lo que permite que se puedan establecer comparaciones entre casi cualquier organismo. Otra característica definitiva son los diferentes niveles de variabilidad que presentan las distintas regiones de la unidad de rDNA (genes codificadores y espaciadores ITS e IGS) (Hillis y Dixon, 1991). Las regiones más conservadas (genes) permiten la comparación de especies más alejadas evolutivamente mientras que el estudio de las regiones variables (espaciadores) permite realizar estudios entre especies más cercanas.

Así, se han desarrollado protocolos de detección por PCR para especies de *Aspergillus* y *Penicillium* basados en genes codificadores de la subunidad pequeña del rRNA de ambos organismos respectivamente (Makimura *et al.*, 1994), mientras que sus regiones espaciadoras se emplean para la identificación de especies del mismo género. Por ejemplo, se ha utilizado la región IGS para la discriminación de especies próximas de *Fusarium* (Patiño *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006).

El empleo de las regiones del rDNA presenta distintas ventajas frente a otras dianas moleculares. En primer lugar, se observa una mayor sensibilidad debida a la existencia de aproximadamente 100-300 copias repetidas en tándem por genoma haploide, así como al patrón de evolución concertada que sucede entre estas copias, lo que tiende a homogeneizarlas (Arnheim *et al.*, 1980). La región ITS tiene un tamaño de aproximadamente 600 pb, mientras que la región IGS tiene entre 1700-2800 pb, y su nivel de variabilidad es menor que la región IGS y mayor que los genes codificadores, lo que la hacen idónea para discriminar especies estrechamente relacionadas en hongos filamentosos (White *et al.*, 1990; Seifert *et al.*, 1995; Guarro *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2000; Parenicová *et al.*, 2001), para la identificación de especies de *Aspergillus* mediante el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de la ITS amplificada mediante PCR (Rath y Ansorg, 2000), y para ensayos de PCR específicos de especies productoras de toxinas (Sugita *et al.*, 2004).

### 5.5. RT-PCR

La aplicación de la técnica de RT-PCR permite la detección del mRNA mediante la amplificación por PCR de sus intermediarios de cDNA, sintetizados por transcripción inversa a partir de dichos mRNAs. Esta técnica ha sido empleada para detectar la expresión de diversos genes fúngicos bajo diferentes condiciones fisiológicas (Edwards *et al.*, 2002). En el caso de hongos productores de toxinas, se puede monitorizar la expresión de los genes implicados en su biosíntesis en respuesta a diferentes condiciones ambientales, estrés biótico y abiótico etc. (Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2007). Así, se ha empleado para hongos productores de aflatoxinas (Sweeney *et al.*, 2000; Scherm *et al.*, 2005; Degola *et al.*, 2007), tricotecenos (Doohan *et al.*, 1999) y fumonisinas (López-Errasquín *et al.*, 2007; Jurado *et al.*, 2008).

### 5.6. PCR CUANTITATIVA

Como ya se ha comentado, existen diversos métodos basados en PCR para la detección de especies fúngicas, incluyendo especies de *Aspergillus* productoras de OTA (Schmidt *et al.* 2003; Dao *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2006). Sin embargo, la PCR convencional sólo permite una detección cualitativa. La recientemente desarrollada PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) permite monitorizar la amplificación en cada ciclo de la PCR mediante el uso de sondas o moléculas fluorescentes (Gizinger, 2002) y es capaz así de estimar la cantidad de DNA genómico inicial (Wilhelm y Pingoud, 2003; Russell y Paterson, 2006). Puede ser realizada tanto con DNA genómico como con cDNA (RT-PCR a tiempo real), permitiendo en éste último caso obtener valores precisos de expresión génica.

A diferencia de la PCR convencional, la qPCR es más rápida y menos laboriosa ya que no requiere la visualización de los productos obtenidos en gel, y esto además reduce el riesgo de contaminación post-PCR (Heid *et al.*, 1996; Schaad y Frederick, 2002). Por otra parte, la qPCR tiene un mayor rango de amplificación de la molécula diana, de cinco a seis órdenes de magnitud, comparado con los dos o tres órdenes de magnitud que se consiguen normalmente mediante PCR convencional (Jordan, 2000). En este caso la cuantificación de DNA es más precisa, ya que está basada en valores de amplificación intermedios en lugar de medidas en el punto final de la reacción (Kabir *et al.*, 2003).

La qPCR puede realizarse mediante el empleo de diferentes moléculas químicas, entre las más utilizadas se encuentran la molécula de SYBR Green I y las sondas TaqMan. El colorante SYBR Green I (Witter *et al.* 1997) detecta DNA bicatenario, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Este compuesto se une al DNA intercalándose en la doble hélice, y genera una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. El problema principal que surge al emplear este tipo de molécula es que la fluorescencia observada puede ser causada tanto por productos de PCR específicos como por no específicos, debido al hecho de que el SYBR Green I se une al DNA de doble hebra presente en la reacción, de manera inespecífica en cuanto a su secuencia. Los ensayos TaqMan permiten aumentar la especificidad mediante la utilización de sondas internas adicionales en la mezcla de reacción (Livak *et al.*, 1995).

Las sondas TaqMan están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo, y presentan en 3' un grupo que absorbe la fluorescencia emitida por dicho fluoróforo ("quencher"). Aunque existen diferentes tipos de sondas TaqMan, dos de las más utilizadas son las sondas TaqMan TAMRA y las sondas TaqMan MGB. Las sondas TaqMan TAMRA incorporan el "quencher" fluorescente TAMRA, mientras que las sondas TaqMan MGB, utilizadas en nuestro estudio, incorporan un "quencher" no fluorescente y además están conjugadas con un grupo MGB ("Minor Groove Binder"), cuya función es aumentar la temperatura de hibridación de la sonda, mejorando así su especificidad.

En los ensayos TaqMan, si la secuencia de DNA complementaria a la sonda está presente en el DNA molde, se produce la hibridación de ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador, degrada la sonda gracias a su actividad 5' exonucleasa. Esta degradación hace que el fluoróforo en 5' y el "quencher" en 3' se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es registrado por el aparato. La separación de la sonda del DNA posibilita que el proceso de extensión del cebador continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad del producto específico generado. A pesar de su gran especificidad, los ensayos TaqMan, y en concreto las sondas TaqMan MGB, constituyen el método menos económico, siendo las técnicas más costosas de entre todas las disponibles en la actualidad para qPCR.

Ambos sistemas de qPCR, basados en SYBR Green y TaqMan, se han empleado con éxito para la cuantificación de hongos en diferentes alimentos como la carne (Bogs *et al.*, 2006), el café (Fungaro *et al.*, 2004) o el trigo (Geisen *et al.*, 2004). La mayoría de protocolos de qPCR desarrollados hasta el momento para especies de *Aspergillus* están basados en genes de copia única (Mulè *et al.*, 2006; Atoui *et al.*, 2007a; Selma *et al.*, 2008), aunque las secuencias multicopia del rDNA descritas pueden ser utilizadas, también en este caso, para aumentar la sensibilidad de la técnica.

### 6. PREVENCIÓN Y CONTROL DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS

La contaminación de los alimentos por micotoxinas se produce de forma natural y puede aumentar como resultado de las condiciones ambientales en el campo o de operaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y elaboración de los productos alimentarios. En este sentido, la prevención se centra, sobre todo, en correctas prácticas agrícolas (GAP: "Good Agricultural Practice") e industriales (GMP: "Good Manufacturing Practice"). Además, en la industria alimentaria se ha desarrollado el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP: "Hazard Analysis and Critical Control Point"), que es un sistema de gestión destinado a garantizar la inocuidad de los alimentos en la cadena alimentaria. El HACCP se incluyó como prioridad en el campo de la seguridad y calidad alimentaria en el VI Programa Marco de la Unión Europea (Comisión Codex Alimentarius, 2002).

Actualmente a nivel mundial, está bien fundamentado el hecho de que la formación de micotoxinas puede ocurrir durante las diferentes etapas del proceso de manejo de los alimentos: pre cosecha, cosecha y procesado o almacenamiento (Cleveland *et al.*, 2003; Perrone *et al.*, 2007). La importancia de cada fase depende de la toxina, de la especie fúngica involucrada y del cultivo. En el género *Aspergillus* el punto crítico más importante es el almacenamiento (Comisión Europea, 2003; Magan y Aldred, 2007). En el caso de los dos sustratos o matrices objeto de este estudio, se ha descrito que la contaminación en uvas se puede producir en el campo en estadios tardíos, antes de la recolección (pre cosecha) (Serra *et al.*, 2003), mientras que los cereales son más susceptibles de contaminación tras la cosecha, y no tanto en campo (Magan y Aldred, 2007). Sin embargo, en España apenas existen datos al respecto.

En la etapa de almacenamiento y secado se debe controlar constantemente que los productos almacenados no estén expuestos a condiciones ambientales tales como la humedad o aireación inadecuada, y elevadas temperaturas (Kabak *et al.*, 2006; Wagacha y Muthomi, 2008).

El control de micotoxinas en alimentos se enfoca en dos estrategias no excluyentes: por una parte inhibir el crecimiento de hongos en el alimento (prevención de contaminación por micotoxinas), y por otro lado en la destrucción de éstas, si es que ya existen en el alimento (detoxificación) (Kabak *et al.*, 2006).

Para inhibir el crecimiento de hongos en los alimentos se utilizan agentes antimicóticos (fungicidas). La industria química ha desarrollado numerosos tratamientos antifúngicos de amplio espectro (benomilo, carbendazima, mancozeb, propiconazol...), que pueden ser empleados para diferentes especies y en diversos cultivos (Yan *et al.*, 1993; Arroyo *et al.*, 2005; Bellí *et al.*, 2006b; Medina *et al.*, 2007). Los conservantes y antioxidantes alimentarios, como el ácido propiónico, el ácido gálico, los benzoatos o las sales de potasio, también son eficaces inhibiendo el crecimiento fúngico en algunos casos (Passone *et al.*, 2005; Palumbo *et al.*, 2007; Melin *et al.*, 2008). Un problema recientemente observado es que algunos de estos productos químicos (antifúngicos o conservantes), especialmente a dosis subletales, pueden estimular la producción de micotoxinas por una activación secundaria de los genes de biosíntesis (Arroyo *et al.*, 2005; Ellner, 2005; Magan, 2006; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008). Además, existe cierta presión social en los últimos años para reducir el uso de aditivos químicos en la industria alimentaria. Los consumidores actuales demandan, cada vez más, alimentos sin sustancias conservantes o antimicrobianas sintetizadas químicamente, y asocian alimentos sanos y seguros con alimentos frescos o mínimamente procesados (Magan, 2006; Wagacha y Muthomi, 2008).

Además del uso de fungicidas o conservantes que actúan para disminuir las micotoxinas existentes en los alimentos, se utilizan distintos procesos basados en la degradación física. Uno de ellos es la aplicación de calor a los alimentos contaminados por micotoxinas (cereales, frutos secos, leche) (Kabak *et al.*, 2006). El inconveniente de este proceso es que las micotoxinas son muy resistentes al calor (Scott, 1984; Castelo *et al.*, 1998; Bullerman y Bianchini, 2007), por lo que habría que aplicar tratamientos térmicos elevados durante periodos de tiempo muy prolongados y eso produce alteraciones en las características organolépticas de los productos (Boudra *et al.*, 1995; Kabak *et al.*, 2006).

Otros métodos físicos y químicos que han sido empleados son el tratamiento con hipoclorito (Castegnaro *et al.*, 1991), la utilización de amoníaco gaseoso o hidróxido de amonio (Chelkowski *et al.*, 1982), tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (Fouler *et al.*, 1994) y radiación gamma (Refai *et al.*, 1996). Sin embargo, estos métodos presentan diferentes grados de éxito y ninguno de ellos se ha recomendado para la detoxificación de grano y semillas contaminadas con OTA (Scott, 1996), por lo que su uso ha ido disminuyendo.

Concretamente, y según la legislación actual, está prohibido tanto la detoxificación química como la mezcla de productos alimenticios que superen los contenidos máximos de micotoxinas con otros que no lo hagan, para así reducir la contaminación en producto final (Comisión Europea, 2006).

Alternativamente, se están investigando métodos de biocontrol basados en la utilización de bacterias y levaduras para evitar el crecimiento fúngico o favorecer la degradación de micotoxinas, aunque su empleo se ha realizado únicamente de manera experimental (Stander *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2000c; Magnusson *et al.*, 2003; Masoud y Kaltoft, 2006).

Debido a estos inconvenientes, es mucho más aconsejable la detección temprana de hongos productores de toxinas para evitar su entrada en la cadena alimentaria, especialmente a nivel agrícola, con el control de la materia prima utilizada tanto para alimentos de consumo animal (forrajes y piensos) como humano (cereales sobre todo, y granos de café o uvas de vino en el caso de las ocratoxinas). Para ello, es clave disponer de métodos que permitan la identificación del material contaminado para tomar las medidas oportunas con el objetivo de evitar nuevas contaminaciones, y evitar que el producto contaminado pase a la cadena alimentaria.

Este trabajo se centra en el desarrollo de métodos de diagnóstico específicos y sensibles para especies productoras de OTA, y su aplicación posterior mediante la realización de estudios epidemiológicos, entre otros, para así conocer la distribución de especies potencialmente productoras de OTA asociadas a una determinada zona geográfica, a un hospedador o a un momento determinado (precosecha o almacenamiento). El conocimiento de los genes implicados en la síntesis y su regulación proporcionará, igualmente, el punto de partida en nuevas y más precisas estrategias de reducción de hongos productores de OTA en alimentos.

## 7. OBJETIVOS

1. Diseñar protocolos rápidos de detección, basados en la técnica de PCR, de las principales especies toxígenas del género *Aspergillus* contaminantes de alimentos (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. ochraceus* y *A. flavus*), y de otras especies relacionadas no productoras de toxinas (*A. japonicus*, *A. ellipticus* y *A. heteromorphus*).
2. Aplicar los protocolos específicos para el conocimiento de la distribución de especies de *Aspergillus* toxígenas en dos importantes sustratos:
  - a. En uvas de viñedos de las Comunidades de Castilla y León y La Rioja.
  - b. En cereales de las Comunidades de Castilla y León y Castilla La Mancha, tanto en muestras de semilla fresca (precosecha) como de seca (almacenaje).
3. Desarrollar y comparar dos protocolos de detección y cuantificación para *A. carbonarius* mediante PCR a tiempo real, con el empleo de SYBR Green I y sonda TaqMan, y comprobar su eficacia en uvas contaminadas artificialmente.
4. Identificar y caracterizar genes implicados en la biosíntesis de OTA en *A. ochraceus* y *A. carbonarius*.
5. Desarrollar un método, basado en la técnica de RT-PCR a tiempo real, para cuantificar los niveles de expresión de genes candidatos de la biosíntesis de OTA en *A. carbonarius*, y estudiar su relación con la producción de dicha toxina.
6. Estudiar el efecto de fungicidas sobre el crecimiento y la producción de OTA en *A. carbonarius*, analizando los niveles de expresión de los genes anteriormente mencionados.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **1. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS**

La relación de los aislamientos utilizados, así como su procedencia y la especie a la que pertenecen se detallan en las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 de "Resultados". Los hongos se mantuvieron en el medio agar patata dextrosa (PDA) (Scharlau Chemie, España), a 4°C mediante resiembras periódicas a una temperatura de incubación de 28°C. La conservación a largo plazo se realizó como suspensión de esporas en glicerol al 15% a -80°C.

Como medio de cultivo general se utilizó Sabouraud (Scharlau Chemie, España). Se inocularon matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio de cultivo. Como inóculo se utilizaron discos de micelio de 8 mm de diámetro obtenidos a partir de cultivos jóvenes de los hongos sobre PDA. Los cultivos se incubaron durante 72 horas en un agitador orbital a 150 rpm a una temperatura de 28°C. El micelio se separó por filtración con una bomba de vacío a través de papel Whatman Nº 1 y se conservó a -80°C.

## **2. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES DE ESPORAS**

Las suspensiones de esporas se prepararon, en todos los casos, a partir de cultivos esporulados de 4-5 días sobre PDA. Las esporas se separaron del micelio empleando suero salino estéril con Tween 80 al 0,05%, se filtraron a través de papel Whatman Nº 1 estéril, se mezclaron con vortex y se ajustaron a una concentración final de  $10^2$  ó  $10^6$  esporas/ml mediante una cámara de recuento de Thomas.

## **3. DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR DE ESPECIES DE *Aspergillus***

### **3.1. Aislamiento de DNA**

Para la extracción de DNA a partir de micelio se cultivaron los hongos en medio de cultivo líquido Sabouraud como se describe en el Apartado 1 de "Material y Métodos". Para la extracción de DNA a partir de cereales las condiciones de incubación se describen en el Apartado 5 de "Material y Métodos".

La extracción de DNA genómico se realizó mediante los kits de extracción de DNA genómico "Genomix" (Talent, Italia) y "DNeasy Plant Mini kit" (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes. En ambos casos, previamente se homogeneizaba la muestra con nitrógeno líquido. Una vez extraído, el DNA genómico se conservó a -20°C.

La concentración de DNA fue estimada por absorción a 260 nm mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos), asumiendo que una concentración de 50 µg/ml corresponde a una unidad de densidad óptica. La integridad del DNA fue comprobada en geles de agarosa como se describe en el Apartado 3.2.

### 3.2. Electroforesis de DNA

El análisis electroforético de DNA se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa de alta temperatura de gelificación (Bio-Rad, Estados Unidos), a diferente concentración (1% y 2,5%) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), y bromuro de etidio (1 µg/ml) a una concentración de 1 µl/20 ml. Los geles al 1% se emplearon para análisis de DNA genómico, productos de PCR y DNA plasmídico, y los geles al 2,5% para el análisis de los productos de digestión con enzimas de restricción y productos de PCR de menos de 200 pb. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8 y azul de bromofenol 0,25%). Se aplicaron 10 µl de muestra.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras se visualizaron mediante irradiación con luz UV (Sambrook y Russell, 2001). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania), que abarca un rango de tamaños desde 100 a 3000 pb, GeneRuler 100 pb (Fermentas, Lituania) (100-1000 pb), o el marcador de bajo peso molecular "Real Escala nº 2" (Durviz, España), con bandas desde 150 a 1000 pb. Para digestiones enzimáticas, se empleó DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst* I (Amersham Life Science, Reino Unido), con fragmentos comprendidos entre 460 y 11500 pb.

### 3.3. Amplificación de la región ITS en *Aspergillus*

La amplificación de la región ITS se realizó usando los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATG 3') (White *et al.*, 1990) y el programa de amplificación descrito por Henry *et al.*, 2000. Las reacciones de PCR se realizaron de la forma que se describe en el Apartado 3.9.

### 3.4. Clonación de fragmentos amplificados por PCR

Para la clonación de productos de PCR se utilizó el kit "TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing" (Invitrogen, Gran Bretaña) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se insertaron en el vector plasmídico pCR®4-TOPO®, el cual se proporciona lineal y con un residuo de desoxitimidina (T) en sus extremos 3'. Esto permite que los productos de PCR, gracias al residuo de desoxiadenosina (A) que añaden las Taq polimerasas a su extremo 3', ligen de forma eficiente con el vector. Los vectores obtenidos después del ligamiento se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5α (TOP10 One Shot®), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. La selección de las colonias transformadas con el vector recombinante se realizó de forma directa cultivando las células durante 16-22 horas a 37°C en placas Petri con agar LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% y agar 2%, pH 7,0) con ampicilina (50 µg/ml) (Sambrook y Russell, 2001). El vector pCR®4-TOPO® contiene el gen letal para *E. coli* *ccd B* fusionado con el *lac Z*α, cuya expresión resulta interrumpida por el ligamiento del producto de PCR. Por tanto, sólo las células transformadas con el vector recombinante podrán crecer y originar una colonia.

La presencia del inserto se comprobó mediante PCR de las colonias utilizando los cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse, incluidos en el kit y siguiendo el protocolo de amplificación indicado en el manual.

Las colonias positivas seleccionadas se cultivaron en LB-ampicilina líquido a 37°C durante 24 horas para la purificación de su DNA plasmídico y el posterior análisis de su secuencia.

### 3.5. Purificación de DNA plasmídico

Para el aislamiento del DNA plasmídico de células de *E. coli* se partió de cultivos con una alta densidad celular en medio líquido LB más ampicilina a una concentración de 50 µg/ml, los cuales se conservaron a -80°C mezclando 100 µl del cultivo con 400 µl de glicerol al 15%.

El DNA plasmídico se extrajo con el kit "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, Alemania), según las indicaciones del fabricante, y su concentración se valoró mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apartado 3.2).

### 3.6. Purificación de productos de PCR

La purificación de productos de PCR en la mezcla de reacción se realizó con el kit "UltraClean™ PCR Clean-Up™" (MoBio Laboratories Inc., Estados Unidos). Los productos purificados se visualizaron en geles de agarosa al 1% (Apartado 3.2).

### 3.7. Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias

La secuenciación de los fragmentos de DNA insertados en el vector plasmídico o de los productos de PCR purificados, se llevó a cabo en la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando el equipo "3730 DNA Analyzer" y el kit "Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Estados Unidos). En todos los casos se analizaron las dos hebras de DNA. La secuenciación de DNA plasmídico se realizó mediante los cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse, y si se trataba de productos de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4, en todos los casos a una concentración de 5 µM.

Para la corrección de las secuencias mediante cromatogramas se utilizó el programa Chromas V 1.43 (Brisbane, Australia). Las secuencias fueron analizadas y editadas utilizando el programa EditSeq del paquete informático DNASTAR (Lasergene, Estados Unidos) y se determinó su grado de similitud con otras secuencias presentes en la base de datos mediante programas como BLASTn, BLASTx y BLASTp (Altschul *et al.*, 1997), ofrecidos por el GenBank (Benson *et al.*, 2002) (<http://www.nlm.nih.gov/>). Las cepas y aislamientos de *Aspergillus* de las que se obtuvo la secuencia de la región ITS1-5,8S-ITS2 aparecen en la Tabla 2.1. Una secuencia representativa de cada especie se ha depositado en la base de datos *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL).

CEPA	ESPECIE	ORIGEN	HOSPEDADOR	Nº ACCESO
229	<i>A. carbonarius</i>	España	Uva	AJ876878
178	<i>A. carbonarius</i>	España	Uva	
207	<i>A. carbonarius</i>	España	Uva	
MUM 04.01	<i>A. carbonarius</i>	Portugal	Uva	
MUM 04.02	<i>A. carbonarius</i>	Portugal	Uva	
MUM 04.03	<i>A. carbonarius</i>	Portugal	Uva	
CECT 2086	<i>A. carbonarius</i>	Canadá		
CECT 2091	<i>A. niger</i>			AJ876876
CECT 2574	<i>A. niger</i>			
CECT 20156	<i>A. niger</i>			
B.ME.A28	<i>A. niger</i>	León (Es)	Uva	
Z.GA.A29	<i>A. niger</i>	Valladolid (Es)	Uva	
T.TT.A2	<i>A. tubingensis</i>	Zamora (Es)	Uva	AJ876877
T.TT.A7	<i>A. tubingensis</i>	Zamora (Es)	Uva	
T.TT.A5	<i>A. tubingensis</i>	Zamora (Es)	Uva	
TR 22 1	<i>A. tubingensis</i>	Palencia (Es)	Trigo duro	
MUCL 13578	<i>A. japonicus</i>			AJ876880
ITEM 4158	<i>A. japonicus</i>	Italia	Uva	
MUCL 31303	<i>A. ellipticus</i>	Costa Rica		AJ876881
CBS 707.79	<i>A. ellipticus</i>	Costa Rica		
CBS 117.55	<i>A. heteromorphus</i>	Brasil		AJ876879
CECT 2093	<i>A. ochraceus</i>			AM997160
CCT 6825	<i>A. ochraceus</i>	Brasil	Café	
U-2003	<i>A. westerdijkiae</i>	Rioja (Es)	Uva	
AL F	<i>A. westerdijkiae</i>			
AL D	<i>A. westerdijkiae</i>			
CECT 2681	<i>A. flavus</i>			
Cab5dch6	<i>A. parasiticus</i>	Albacete (Es)	Cebada	
M6hip1	<i>A. tamarii</i>	Albacete (Es)	Pan	

**Tabla 2.1.** Cepas de *Aspergillus* de las que se obtuvo la secuencia de la región ITS1-5,8S-ITS2, origen, hospedador, y número de acceso en la base de datos EMBL de las secuencias representativas.

Las secuencias de nucleótidos se alinearon con el programa MegAlign, programa también incluido en el paquete DNASTAR, con el método Clustal (Wilbur y Lipman, 1983).

### 3.8. Diseño de cebadores específicos

Para el diseño de cebadores a partir de las secuencias obtenidas se utilizó el programa PrimerSelect, obtenido del paquete informático DNASTAR (Lasergene, Estados Unidos). La elección de cebadores se realizó en regiones con variabilidad de secuencia entre especies y sin variabilidad intraespecífica, con objetivo de lograr una mayor especificidad.



Se evitaron en lo posible las zonas de inestabilidad con alto contenido de adeninas/timinas (especialmente en los extremos de los cebadores), la posible formación de bucles de cebador o la posibilidad de hibridación inespecífica entre cebadores. Para la puesta a punto y optimización de los programas de amplificación se consideraron, especialmente, el tamaño de fragmento amplificado, la temperatura de hibridación de los cebadores y el número de ciclos de amplificación.

### 3.9. Ensayos de PCR

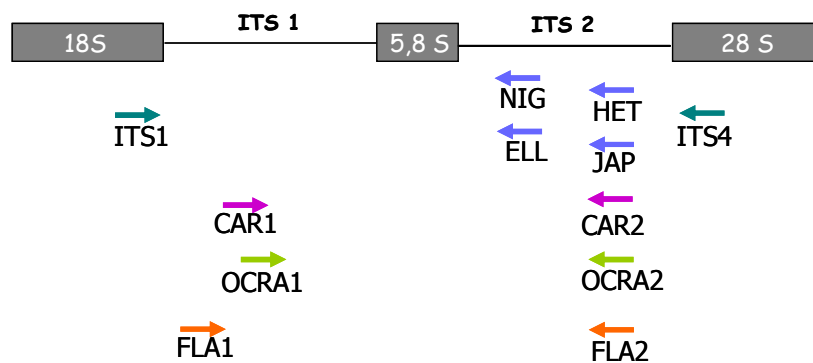
El rango de concentración de DNA genómico molde utilizado en las reacciones de amplificación se encontraba entre 32 pg y 120 ng, excepto cuando el DNA molde procedía de una extracción a partir de cereal contaminado, en cuyo caso se partió de 150-200 ng. Se realizó en todos los casos en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania).

El volumen total de la reacción (25 µl) contenía los siguientes reactivos: 2 µl de DNA genómico, y las siguientes cantidades y concentraciones de los otros reactivos: 0,5 µl de mezcla de dNTPs (25 mM cada uno), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de cada cebador correspondiente (20 µM cada uno), una unidad de Taq DNA polimerasa (Biotools, España) y 2,5 µl de tampón 10X sin MgCl<sub>2</sub> (166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM TRIS-HCl pH 8,8 y 0,1% Tween-20).

Los cebadores que se describen en la Tabla 2.2 se diseñaron a partir de las secuencias de la región ITS1-5,8S-ITS2 de varias cepas y especies de *Aspergillus* (Ver Tabla 2.1). Los cebadores específicos para el agregado *A. niger*, *A. japonicus*, *A. ellipticus* y *A. heteromorphus* (NIG, JAP, ELL y HET respectivamente) se combinaron en todos los casos con el cebador general de ITS en *Aspergillus*, ITS1 (White *et al.*, 1990). En el caso de *A. ochraceus*, se diseñaron dos cebadores específicos (OCRA1 y OCRA2), así como para las especies *A. carbonarius* (CAR1 y CAR2) y *A. flavus* (FLA1 y FLA2). En la Figura 2.1 se indica la posición relativa, en las regiones ITS, de los cebadores diseñados, y las de los cebadores ITS1 e ITS4.

Especie	Nombre	Secuencia (5'-3')	TH (°C)	Tamaño (pb)	Posición en ITS
<i>A. carbonarius</i>	CAR1	GCATCTCTGCCCCTCGG	59	~420	+91
	CAR2	GGTTGGAGTTGTCGGCAG			+480
Agregado <i>A. niger</i>	NIG	CCGGAGAGAGGGGACGGC	66	~420	+374
<i>A. japonicus</i>	JAP	GAGAAGATTGGGGGTCGAGG	62	~520	+466
<i>A. ellipticus</i>	ELL	CCCGGGATGGGGGACGG	65,5	~420	+376
<i>A. heteromorphus</i>	HET	GGAAAATGGTTGGAGAGGTCG	65	~540	+483
<i>A. ochraceus</i>	OCRA1	CTTCCTTAGGGGTGGCACAGC	63	~400	+76
	OCRA2	GTTGCTTTTCAGCGTCGGCC			+462
<i>A. flavus</i>	FLA1	GTAGGGTTCCTAGCGAGCC	58	~500	+7
	FLA2	GGAAAAAGATTGATTGCGTTC			+482

**Tabla 2.2.** Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de DNA genómico y tamaño de los productos de PCR obtenidos. TH=Temperatura de hibridación utilizada en los ciclos de amplificación. Las posiciones de los cebadores se calculan tomando como referencia el inicio de la región ITS1 de las cepas cuyo número de acceso se indica en la Tabla 2.1 y de la cepa CECT 2681 de *A. flavus*.



**Figura 2.1.** Posición relativa de los cebadores ITS1 e ITS4, y de los cebadores específicos diseñados en este trabajo.

El programa de amplificación utilizado constaba de un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 4 minutos y 30 segundos, seguido de 30 ciclos de amplificación, en el caso de los cebadores OCRA1 y OCRA2, y 25 ciclos para el resto de cebadores que se indican en la Tabla 2.2.

Cada ciclo de amplificación consistió en un paso de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 25 segundos a la temperatura de hibridación adecuada para cada pareja de cebadores (ver Tabla 2.2) y 40 segundos de extensión a 72°C. El programa terminaba con un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72°C y parada a 4°C.

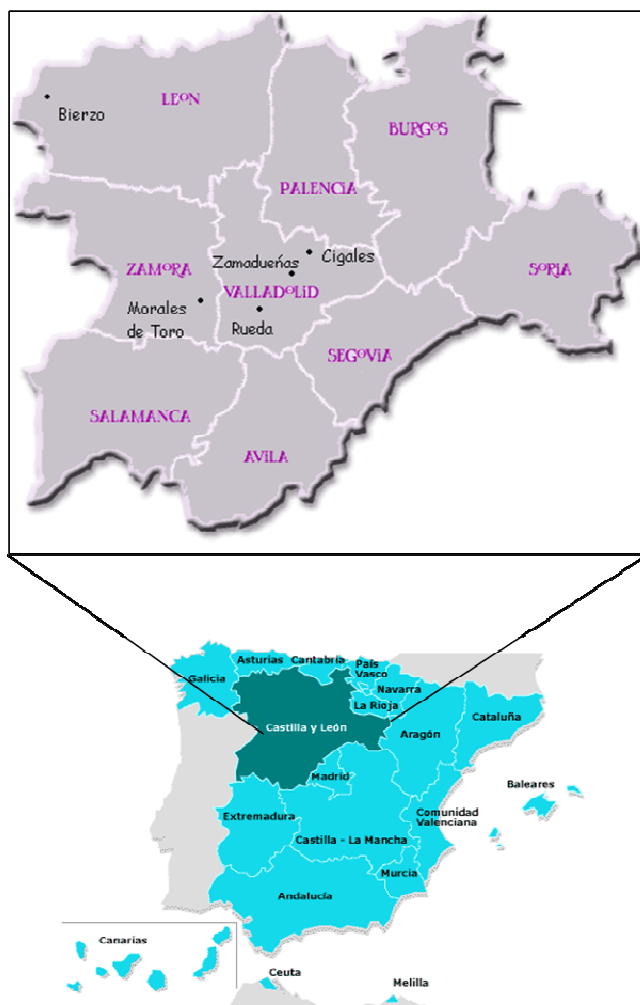
### 3.10. Digestiones con endonucleasas de restricción

Para realizar la distinción entre especies del agregado *A. niger*, alícuotas de 10 µl del producto de PCR se incubaron con la endonucleasa *Afa* I (*Rsa* I) (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), con diana de 4 pb, en un volumen total de 40 µl (Sambrook y Russell, 2001). Los patrones de digestión se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% (Apartado 3.2).

## 4. DETECCIÓN DE HONGOS TOXÍGENOS EN UVAS DE VINO

Las uvas de vino se recolectaron durante las campañas de los años 2001 a 2003 siempre durante los meses de Septiembre y Octubre, en un solo estadio de desarrollo de la uva correspondiente a la madurez (previo a la cosecha). Las muestras se recogieron en 5 localidades de Castilla-León y en La Rioja (Haro) (Figura 2.2). Las 5 localidades situadas en Castilla y León, así como la Comunidad Autónoma de La Rioja, se encuentran en una misma área climática (mediterránea templada), según la clasificación climática de Papadakis (<http://www.mapya.es/siga/mapas/siga.mwf>).

Las muestras recogidas pertenecían a 6 denominaciones de origen (D.O. Bierzo, Cigales, Ribera del Duero, Rueda, Toro y Rioja) y 13 variedades de uva: 6 tintas (Cabernet Sauvignon, Garnacha, Mencía, Merlot, Tempranillo y Tinta de Toro) y 7 blancas (Albillo, Macabeo, Viura, Malvasía, Pedro Ximénez, Verdejo y Malfar). Las muestras se trasladaron desde sus respectivos lugares de origen, se dataron y se almacenaron en cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su análisis.



**Figura 2.2.** Situación de las localidades de Castilla y León y La Rioja analizadas.

Para la obtención de aislamientos, se homogeneizaron 10 g de uvas en 90 ml de suero salino (0,9%), y se realizó un banco de diluciones. Se inocularon placas de medio Sabouraud-dextrosa-cloramfenicol-gentamicina (Scharlau Chemie, España) con 500 µl de las diferentes diluciones y se incubaron a 28°C durante 3, 4 ó 5 días, y se aislaron colonias fúngicas hasta obtener cultivos puros.

La identificación inicial de los aislamientos fúngicos se realizó mediante métodos basados en características morfológicas, en colaboración con Carlos Soldevilla, del Departamento de Producción Vegetal, Botánica y Protección Vegetal (Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal, Universidad Politécnica de Madrid). Para la identificación de las colonias aisladas, se cultivaron en los medios generales PDA (agar patata dextrosa) (Oxoid Ltd., Reino Unido) y MEA (agar extracto de malta) (Panreac

Química S.A., España), los cuales garantizan la formación de micelios y estructuras de reconocimiento. Posteriormente, se hicieron lecturas cada 7 días para el control de las colonias fúngicas, y repicado a placas Petri para su identificación. En la determinación de las especies se tuvieron en cuenta diversas obras generales (Carmichael *et al.*, 1980; Von Arx, 1981; Smith *et al.*, 1992; Watanabe, 1994; Kiffer y Morelet, 1997; Barnett y Hunter, 1998; Sutton *et al.*, 1998). En el caso de géneros con especies micotoxígenas se consultaron textos más específicos (Ramírez, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Klich y Pitt, 1998; Pitt, 2000).

Se analizaron, mediante PCR, un total de 51 aislamientos así obtenidos, de los cuales 48 procedían de uvas de Castilla-León y únicamente tres procedían de uvas de La Rioja. La determinación de las especies de *Aspergillus* a partir de los aislamientos mencionados se realizó mediante los ensayos específicos descritos en el Apartado 3 de “Material y Métodos”.

### 5. DETECCIÓN DE HONGOS TOXÍGENOS EN CEREALES

Las muestras de cereales se recogieron en los años 2006 y 2007, durante los meses de Mayo y Junio. Se analizaron 95 muestras de cereales procedentes de tres localidades de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Villabáñez y Zamadueñas en Valladolid, y Villahoz en Burgos), y una de Castilla La Mancha (Albacete). Las muestras procedentes de Castilla y León fueron recogidas en campos experimentales del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), y las de Albacete en campos del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP).

Las especies de cereales analizadas fueron cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo blando (*Triticum aestivum* L.). Del total de muestras analizadas, 53 fueron de cebada y 42 de trigo, y procedían de dos estadios de desarrollo del cereal correspondientes a la última etapa de formación de la semilla (precosecha, 69 muestras), y tras el período de recolección (semilla seca, 26 muestras). La situación de las localidades de toma de las muestras aparece representada en el mapa de la Figura 2.3. La variedad, procedencia y número de muestras analizadas están recogidos en la Tabla 2.3. Las muestras se trasladaron desde sus respectivos lugares de origen, se dataron y se almacenaron en cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su análisis.



**Figura 2.3.** Situación de las localidades analizadas en Castilla y León y Albacete.

CEREAL	VARIEDAD	PROCEDENCIA
CEBADA ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Hispanic	Albacete * (6)
		Villabáñez (Va) * (3)
		Zamadueñas (Va) (4+3)
		Villahoz (Bu) (3+3)
	Cierzo	Albacete * (6)
TRIGO ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Candeal Argelino	Villabáñez (Va) * (3)
		Zamadueñas (Va) (4+3)
	Candeal Nava del Rey	Villahoz (Bu) (3+3)
		Zamadueñas (Va) (6+3)
	Candeal Salamanca	Villahoz (Bu) (2+2)
		Zamadueñas (Va) * (2)
	Isengrain	Villahoz (Bu) (2+2)
		Zamadueñas (Va) * (2)
	Marius	Villahoz (Bu) (2+2)
		Zamadueñas (Va) * (2)
	Mombuey	Villahoz (Bu) (2+2)
		Zamadueñas (Va) * (2)
	Pane 247	Villahoz (Bu) (2+2)
		Zamadueñas (Va) * (2)

**Tabla 2.3.** Variedades y procedencias de las semillas analizadas. \* = Muestras analizadas solamente del año 2006. • = Muestras analizadas solamente del año 2007. Entre paréntesis se indica el número de muestras analizadas por procedencia durante el año 2006 (primer número de la suma) y 2007 (segundo número de la suma). (Va): Valladolid, (Bu): Burgos.

Se tomaron 4 gramos de cada muestra y se incubaron en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml medio líquido Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, Madrid), durante 5 días a 28°C, en agitación. Tras la incubación, el contenido del matraz se separó del líquido por filtración con una bomba de vacío a través de papel Whatman Nº 1 y se conservó a -80°C hasta el momento de su análisis (Ver Apartado 3 de "Material y Métodos").

### **6. ENSAYOS DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *A. carbonarius***

#### **6.1. Diseño de cebadores**

Para el diseño de los cebadores, previamente se realizó un alineamiento de la región ITS1-5,8S-ITS2, utilizando las secuencias de los hongos que aparecen en la Tabla 2.1, y se seleccionaron las regiones más variables para introducirlas en el programa Primer Express (Applied Biosystems, Estados Unidos) de la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Entre todos los cebadores obtenidos con dicho programa, se seleccionaron los más idóneos en cuanto a variabilidad de secuencia y especificidad.

#### **6.2. Reacciones de PCR a tiempo real con SYBR Green I**

La cuantificación por PCR a tiempo real permite monitorizar la reacción de PCR al mismo tiempo que ésta tiene lugar. Se emplearon los dos tipos de estrategias disponibles para realizar ensayos de cuantificación por PCR a tiempo real, SYBR Green I (Witter *et al.* 1997), y TaqMan (Livak *et al.*, 1995, Apartado 6.3).

Una vez obtenido el DNA genómico (Apartado 3.1), las reacciones de PCR a tiempo real con SYBR Green I se llevaron a cabo utilizando los cebadores específicos QCARBO1 (5' GGGCTTTGTACATGCTCTGTA 3') y QCARBO2 (5' CTGGAAAAAAGGTT GGAGTTGTC 3'), que amplifican un fragmento de 66 pb de la región ITS en *A. carbonarius*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real "ABI PRISM 7700" (Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizando la mezcla maestra "SYBR® Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems, Estados Unidos). Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas y listo para su uso, la enzima "AmpliTaq Gold® DNA Polymerase", dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y el tampón de PCR, e incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR Green I, que detecta DNA de doble hélice, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con los siguientes elementos: 10 µl de la mezcla maestra "SYBR® Green PCR Master Mix", 3 µl de agua Mili-Q, 1 µl de cada cebador 5 µM (siendo su concentración final 250 nM) y 5 µl de DNA. Las condiciones térmicas de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C (activación enzimática), seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización y extensión).

Al final de cada reacción, se llevó a cabo un protocolo de disociación para asegurar la presencia del producto de PCR específico que se intentaba amplificar. Las curvas de disociación fueron programadas de la siguiente manera: un ciclo de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C, 20 minutos de subida lenta de temperatura y otros 15 segundos a 95°C. Los datos para la curva de disociación fueron capturados durante la rampa de subida de temperatura y las curvas de disociación se visualizaron mediante el programa correspondiente del aparato ABI PRISM 7900.

### 6.3. Reacciones de PCR a tiempo real con sonda TaqMan

Los cebadores descritos QCARBO1 y QCARBO2, específicos para *A. carbonarius*, se utilizaron en PCR a tiempo real en combinación con una sonda TaqMan-MGB específica, (5' 6FAM-ATTGGCCGGCGCCT-MGB 3'), diseñada en nuestro laboratorio y complementaria a una región interna del producto que se desea amplificar con dichos cebadores. La sonda estaba marcada en el extremo 5' con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína, FAM<sup>TM</sup>. Además, este tipo de sondas presentan en 3' un grupo que absorbe la fluorescencia emitida por el fluoróforo ("quencher"), y están conjugadas con un grupo MGB ("Minor Groove Binder"), cuya función es aumentar la temperatura de hibridación de la sonda, mejorando así su especificidad.



Como en el caso anterior (Apartado 6.2), las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real "ABI PRISM 7700" (Applied Biosystems, Estados Unidos), pero utilizando la mezcla maestra "TaqMan Universal PCR Master Mix" (Applied Biosystems, Estados Unidos). Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas y listo para su uso, la enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y el tampón de PCR. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones de PCR cuantitativa (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con los siguientes elementos: 10 µl de la mezcla maestra "TaqMan Universal PCR Master Mix", 5,95 µl de agua Mili-Q, 1 µl de cada cebador 5 µM (siendo su concentración final 250 nM), 0,05 µl de sonda MGB a 100 µM (siendo su concentración final 250 nM) y 2 µl de DNA. Las condiciones térmicas de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C (activación enzimática), seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización y extensión).

Los resultados de las reacciones de PCR cuantitativa se expresan como el incremento de la señal de fluorescencia de la molécula química empleada en cada caso. El aumento de esta señal es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en la reacción. En los ciclos iniciales de la reacción, hay un cambio muy leve en la señal de fluorescencia. Este estado define la línea base ("threshold") de la amplificación, y el parámetro más importante para el análisis de los datos, el valor C<sub>T</sub>, que representa el ciclo en el cual la emisión de fluorescencia excede la línea base marcada. La cuantificación de las muestras problema de DNA se llevó a cabo interpolando los valores C<sub>T</sub> de las muestras en una curva estándar.

### 6.4. Curvas estándar

Las curvas estándar fueron construidas usando diluciones decimales de DNA desde 25 a  $2,5 \times 10^{-5}$  ng de DNA genómico por reacción de las cepas de *A. carbonarius* 171, 173 y 325 (Tabla 3.1 de "Resultados"), cuyas concentraciones fueron determinadas espectrofotométricamente (Sambrook y Russell, 2001) con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Estados Unidos). La curva estándar se representó interpolando el valor C<sub>T</sub> obtenido en cada caso en ordenadas y el logaritmo de la concentración de DNA en abscisas.

La cantidad de DNA en muestras problemas se calculó mediante el correspondiente programa informático asociado al equipo ABI PRISM 7900 usando estas curvas estándar.

#### 6.5. Especificidad del ensayo

La especificidad y sensibilidad de los cebadores fue comprobada en mezclas de DNA de *A. carbonarius* (cepas 171 y 325) (Tabla 3.1 de "Resultados"), con DNA de otras especies de *Aspergillus*, así como con DNA de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*. Para ello, los DNAs empleados fueron diluidos hasta una concentración de 0,5 ng/μl, y luego mezclados en las siguientes proporciones: *A. carbonarius* - *A. niger* (50:50 y 25:75, respectivamente), *A. carbonarius* - *A. ochraceus* (50:50 y 72:25, respectivamente), *A. carbonarius* - *A. flavus* (50:50 y 25:75, respectivamente), *A. carbonarius* - *A. niger* - *A. ochraceus* (33:33:33), *A. carbonarius* - *Fusarium culmorum* (50:50), *A. carbonarius* - *Penicillium verrucosum* (50:50), *A. carbonarius* - *Alternaria consortiale* (50:50), *A. consortiale* - *F. culmorum* (50:50), *A. niger* (100) y *A. niger* - *A. ochraceus* (50:50).

#### 6.6. Método de contaminación de uvas con cepas de *A. carbonarius*

Las uvas empleadas para el análisis fueron previamente desinfectadas en superficie mediante los siguientes tratamientos: 5 minutos en etanol al 96 %, seguido de 5 minutos en hipoclorito sódico (10%), 1 minuto en etanol al 96 % y aclarado en agua bidestilada. Posteriormente, se secaron a temperatura ambiente para su inoculación en una campana de flujo laminar.

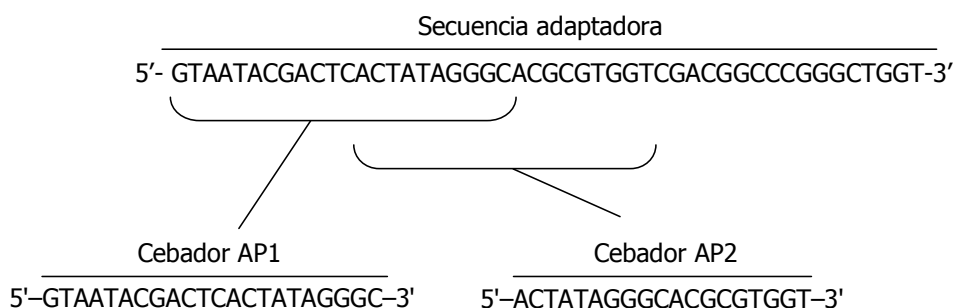
Las muestras de 1,5 g de uva blanca comercial (Vinalopó, Alicante) troceada se situaron en placas Petri estériles de 5 cm de diámetro, y se inocularon con 1 ml de suspensiones de  $10^3$  y  $10^6$  esporas/ml (Ver Apartado 2 de "Material y Métodos") de tres cepas de *A. carbonarius*: 171, 173 y 325 (Tabla 3.1 de "Resultados"). Posteriormente, se incubaron a una temperatura de 28°C durante 8, 16 y 24 h respectivamente. También se analizaron muestras inoculadas sin incubar. Como control negativo se utilizaron muestras de uva inoculadas con suero salino. Tras la incubación, las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

## 7. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. ochraceus* Y *A. carbonarius*

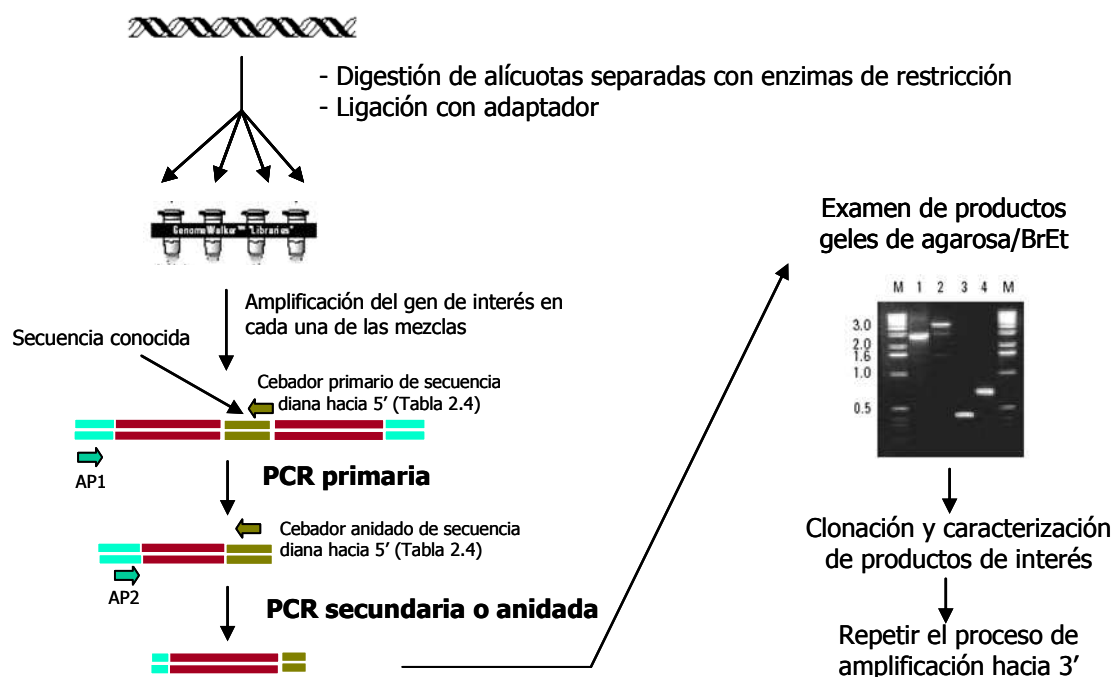
### 7.1. Paseo cromosómico ("Genome walking")

Para la obtención de la secuencia completa del gen del citocromo *p450-B03* de *A. ochraceus* a partir del fragmento de N° de acceso DQ054596, descrito por O'Callaghan *et al.* en 2006, se utilizó el método denominado paseo cromosómico o "genome walking", que permite amplificar por PCR fragmentos de DNA cuya secuencia se desconoce pero que flanquean regiones de DNA conocidas. Se empleó el kit "GenomeWalker™ Universal" (BD Biosciences Clontech, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El primer paso consistió en la digestión del DNA genómico de la cepa HP99 de *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003), por separado y con cuatro enzimas de restricción distintas que producen extremos romos: *Eco* RV, *Dra* I, *Pvu* II y *Stu* I. Posteriormente, las cuatro digestiones de 100 µl obtenidas se purifican, de forma independiente, y se ligan a una secuencia nucleotídica adaptadora (Figura 2.4), incluida en el kit, todo ello siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación, con cada una de las mezclas así obtenidas se realiza una PCR primaria, utilizando un cebador (AP1, incluido en el kit) que se une al adaptador (Figura 2.4) y un cebador específico del gen (Tabla 2.4), y una PCR secundaria o anidada ("nested") utilizando un cebador, más interno, que se une al adaptador (AP2, incluido en el kit) y otro cebador, también más interno, diseñado a su vez en función de la región de gen conocida del citocromo *p450-B03*, DQ054596 (ver Tabla 2.4 y Figuras 2.4 y 2.5).



**Figura 2.4.** Estructura de la secuencia adaptadora y situación de los cebadores AP1 y AP2.



**Figura 2.5.** Esquema de la técnica de paseo cromosómico.

Cada una de las reacciones de PCR (primaria y anidada) se realizó para ambos extremos del gen, en sentido 5' y 3', en dos rondas. Los cebadores diseñados a partir del fragmento génico conocido del gen citocromo P450 para realizar el paseo cromosómico se muestran en la Tabla 2.4. El diseño de cebadores se realizó siguiendo las instrucciones del kit y con la ayuda adicional del programa PrimerSelect, obtenido del paquete informático DNASTAR (Lasergene, Estados Unidos).

Nombre	Secuencia (5'-3')	TH (°C)	Tipo de PCR	Ronda
B03_5GW OP1	TCAACTACCTAGACGACCCCGAGATGG	68	Primaria en 5'	1
B03_3GW OP1	CCATCTCGGGGTCGTCTAGGTAGTTGA	68	Primaria en 3'	1
B03_5GW NOP1	GAATGAAATGTGCCAGGAGGTGAACT	65,2	Anidada en 5'	1
B03_3GW NOP1	GTGATAATGTGCGCGGTGAAACAGTTG	64,7	Anidada en 3'	1
B03_5GW 2nd 1	TGCCAACCAGATACGTGATTTAGTGCC	71	Primaria en 5'	2
B03_3GW 2nd 1	TCGTGTCAGTCCTGTTCAAACTCCAC	70	Primaria en 3'	2
B03_5GW 2nd 2	CGATGGATGATACCCTTTTGTCTACGG	70	Anidada en 5'	2
B03_3GW 2nd 2	TCCTCCTGCACCCTTCGAACTGAATCC	72	Anidada en 3'	2

**Tabla 2.4.** Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación para paseo cromosómico. TH = Temperatura de hibridación de los cebadores.

Las reacciones de PCR se realizaron con cada una de las mezclas de restricción de DNA genómico, utilizando para ello una DNA polimerasa termoestable recomendada para la amplificación de fragmentos de gran tamaño ("Advantage<sup>®</sup> 2 PCR kit", BD Biosciences Clontech, Estados Unidos). Se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial tanto para la realización de las mezclas de reacción como para los programas de amplificación.

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante el paseo cromosómico se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% realizados como se describe en el Apartado 3.2, con la excepción de que se utilizó el marcador de alto peso molecular GeneRuler 1kb Plus (500-20000 pb). Para la recuperación de fragmentos de DNA de los geles se utilizó el kit "QIAEXII Gel Extraction Kit" (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación, se clonaron como se describe en el Apartado 3.4 y se secuenciaron mediante el servicio AGOWA (AGOWA GMBH, DNA Sequencing Services, Alemania).

### 7.2. PCR con cebadores degenerados

Con el objetivo de amplificar el gen de la monooxigenasa del citocromo P450 de *A. carbonarius*, se diseñaron cebadores degenerados a partir de su gen homólogo obtenido en *A. ochraceus*, mediante el alineamiento y comparación con otras secuencias de genes citocromo P450 en distintas especies de *Aspergillus* y *Fusarium*. Las secuencias empleadas fueron, concretamente, genes codificadores de P450 de las especies *A. niger* (XP\_001397311), *A. fumigatus* (XP\_748206), *A. nidulans* (XP\_659398), *A. flavus* (AAS89997), *A. nomius* (AAS90045), *A. parasiticus* (AAS66021), *F. cerealis* (AAM48764) y *F. culmorum* (AAM49028). Los cebadores degenerados (Tabla 2.5) procuraron diseñarse en base a regiones conservadas, pero no en los motivos invariables, ya que esto último podría, en mayor medida, dar lugar a la amplificación de citocromos P450 con otras funciones no relacionadas con la síntesis de micotoxinas. Concretamente, se situaron en el motivo de unión a membrana del extremo N-terminal (cebador p450 CARB 1F), la zona de transferencia de protones de la hélice I (cebador p450 CARB 1R), y el inicio de las hélices K y L (cebadores p450 CARB 2F y p450 CARB 2R) (Figura 3.20 de "Resultados").

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')
p450 CARB 1F	CCTGGICCSAARCTGGCTGC
p450 CARB 1R	CGTIGTCTCGAAICCGGC
p450 CARB 2F	TAGARAAGCTCCCITACYTG
p450 CARB 2R	CCAKCGCTCIGGCTTGAA

**Tabla 2.5.** Cebadores degenerados utilizados para amplificar el gen de la monooxigenasa del citocromo p450 en *A. carbonarius*. I=Inosina (A+T+C+G), S=G+C, R=A+G, Y=C+T, K=G+T

El volumen total de la reacción (50 µl) contenía los siguientes reactivos: 3 µl de DNA genómico molde de la cepa 325 de *A. carbonarius*, obtenido como se indica en el Apartado 3.1, y las siguientes cantidades y concentraciones de otros componentes: 4 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl de cada cebador (20 µM cada uno), dos unidades de Taq DNA polimerasa (Roche, Alemania) y 5 µl de tampón 10X sin MgCl<sub>2</sub> (166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM TRIS-HCl pH 8,8 y 0,1% Tween-20). Se realizó en todos los casos en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania).

Los programas de amplificación utilizados fueron dos, dependiendo del tamaño del amplicón que se esperaba. Los cebadores p450 CARB 2F y p450 CARB 2R se esperaba que amplificasen una secuencia de aproximadamente 300 pb, por lo que el programa de amplificación utilizado constaba de un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 5 ciclos primarios de amplificación, con un paso de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 45°C (hibridación) y 30 segundos de extensión a 72°C. A éstos ciclos les sucedían otros 30 ciclos de amplificación secundarios, con un paso de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 59°C (hibridación) y 30 segundos de extensión a 72°C. El programa terminaba con un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C y parada a 4°C.

Los cebadores p450 CARB 1F y p450 CARB 1R se esperaba que amplificasen un fragmento de aproximadamente 850 pb y los cebadores p450 CARB 1F y p450 CARB 2R uno de aproximadamente 1400 pb. En este caso, el programa de amplificación fue similar al descrito anteriormente, exceptuando los tiempos de desnaturalización, hibridación y extensión, que se realizaron durante 1, 1 y 2 minutos respectivamente.

Los productos de amplificación se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% (Apartado 3.2 de "Material y Métodos"). Los fragmentos de DNA del tamaño esperado, amplificados mediante el uso de estos cebadores se recuperaron de los geles utilizando el kit "QIAEXII Gel Extraction Kit" (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación, se clonaron como se describe en el Apartado 3.4 y se secuenciaron mediante el servicio AGOWA (AGOWA GMBH, DNA Sequencing Services, Alemania).

### **8. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO ÓPTIMAS PARA PRODUCCIÓN Y NO PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN *A. carbonarius***

Para inducir la producción de OTA en *A. carbonarius* se empleó el medio de cultivo CYA, compuesto por agar Czapek Dox (45,4 g/l), extracto de levadura (20 g/l) y  $K_2HPO_4$  (1 g/l). El pH se ajustó a 6,0 mediante la adición de HCl. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Como medio en el que *A. carbonarius* no es capaz de producir OTA se empleó YES, compuesto por sacarosa (150 g/l), extracto de levadura (20 g/l) y agar (20 g/l). El pH se ajustó a 8,3 mediante la adición de NaOH. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

En ambas condiciones permisivas y restrictivas para la producción de OTA, el medio descrito en cada caso se dispensó en placas Petri de 8,5 cm de diámetro, con 20 ml aproximadamente.

Para los ensayos de cinética de producción de OTA, se inocularon las placas depositando 2 µl de una suspensión de  $10^6$  esporas/ml (ver preparación en Apartado 2 de "Material y Métodos") en el centro de las mismas, en condiciones de esterilidad. La incubación se llevó a cabo en estufa a 28°C para el medio YES, y a 20°C para el medio CYA, durante 21 días, tomándose muestras de las placas al cabo de 4, 7, 10, 13, 17 y 21 días, también en condiciones de esterilidad. La toma de muestras y el análisis de OTA se realizó como se describe en el Apartado 11 de "Material y Métodos". Los ensayos se realizaron empleando las cepas 325, 168 y 173 de *A. carbonarius* (Tabla 3.1 de "Resultados"), y en cada caso por triplicado.

Para los ensayos de expresión mediante PCR a tiempo real, una vez solidificado el medio se cubrió con un disco de celofán poroso (8,5 cm, P400; Cannings, Reino Unido) del mismo diámetro que las placas, y esterilizado en autoclave a 121°C 20 minutos. Como en el caso anterior, la inoculación de las placas se realizó depositando 2 µl de una suspensión de 10<sup>6</sup> esporas/ml (ver preparación en Apartado 2 de "Material y Métodos") en el centro de las mismas, en condiciones de esterilidad, y la incubación se llevó a cabo en estufa a 28°C para el medio YES, y a 20°C para el medio CYA, pero durante 5 días. Una vez finalizado el período de incubación, el micelio se separó retirando el celofán de las placas, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta el momento de su análisis. La toma de muestras para el análisis de OTA se realizó, una vez retirado el micelio, como se describe en el Apartado 11 de "Material y Métodos". Los ensayos se realizaron con las cepas de *A. carbonarius* 168, 173, 325 y MUM 04.01 (Tabla 3.1 de "Resultados"), y en cada caso por triplicado.

## **9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *p450* Y *AcKS9* DE *A. carbonarius* MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL**

### **9.1. Aislamiento de RNA**

Para el aislamiento de RNA total se utilizó el kit "RNeasy Plant Mini kit" (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar la posible contaminación con DNA, el RNA se trató con desoxirribonucleasa I, durante el proceso de extracción, en el paso de purificación con el kit "RNase-Free DNase Set" (Qiagen, Alemania), durante 15 minutos a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración de RNA fue estimada por absorción a 260 nm mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos), asumiendo que una concentración de 40 µg/ml se corresponde con una unidad de densidad óptica. El RNA obtenido se mantuvo a -80°C para su uso posterior.

### **9.2. Electroforesis de RNA**

El análisis electroforético de RNA se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa de alta temperatura de gelificación (Bio-Rad, Estados Unidos), al 1%, en tampón TAE



(Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), y bromuro de etidio (1 µg/ml) a una concentración de 1 µl/20 ml. Toda el agua utilizada para realizar los tampones se trató con dietilpirocarbonato (DEPC), a una concentración de 1 ml/l de agua destilada, durante 24 horas a 37°C, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8, cianol xilano 0,25% y azul de bromofenol 0,25%). Se aplicó 1 µg de muestra.

El material utilizado para las electroforesis fue lavado previamente con una solución de peróxido de hidrógeno al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras se visualizaron mediante irradiación con luz UV (Sambrook y Russell, 2001). El marcador de peso molecular utilizado fue el Ladder Plus de 100 pb (Fermentas, Lituania).

### 9.3. Síntesis de cDNA

El cDNA fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA total libre de DNA. Las mezclas de reacción contenían 4 µl del tampón de reacción 5X, 2 µl de solución de dNTPs 10 mM, 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl (50U) de la enzima transcriptasa inversa "Expand Reverse Transcriptase 50 U/µl" (Roche, Alemania), 3 µl de Cebadores Aleatorios ("Random Primers") a 200 µg/ml (Promega, Estados Unidos) y agua DEPC en un volumen final de reacción de 20 µl. El programa de transcripción inversa consistió en un ciclo de 10 minutos a 30°C (hibridación), un ciclo de 45 minutos a 42°C (transcripción inversa) y parada a 4°C, y se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania). El cDNA así obtenido se conservó a -20°C.

Para comprobar la integridad del cDNA y su posible contaminación con DNA, se realizaron amplificaciones mediante PCR convencional empleando los cebadores CALMF (5' GGCCAGATCACCAAG 3') y CALMR (5' TCACGGATCATCTCATCGAC 3'), diseñados en el laboratorio del Prof. Alan Dobson, en el University College Cork (Irlanda). Estos cebadores amplifican un fragmento del gen de la calmodulina en *Aspergillus*, y contienen en su interior un intrón, de manera que se obtiene un fragmento de 370 pb en el DNA genómico y de 300 pb en el cDNA.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25 µl, que contenía los siguientes reactivos: 0,5 µl de cDNA, y las siguientes cantidades y concentraciones de los otros reactivos: 0,5 µl de mezcla de dNTPs (25 mM cada uno),

1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de cada cebador correspondiente (20 µM cada uno), una unidad de Taq DNA polimerasa (Biotools, España) y 2,5 µl de tampón 10X sin MgCl<sub>2</sub> (166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM TRIS-HCl pH 8,8 y 0,1% Tween-20).

El programa de amplificación constaba de un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 4 minutos y 30 segundos, seguido de 29 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consistió en un paso de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 56°C (hibridación) y 40 segundos de extensión a 72°C. El programa terminaba con un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72°C y parada a 4°C. Los productos PCR se observaron mediante electroforesis estándar en geles de agarosa al 1% en tampón TAE como se describe en el Apartado 3.2 de "Material y Métodos".

#### 9.4. Reacciones de RT-PCR a tiempo real

Una vez obtenido el cDNA y comprobada su integridad, se amplificó mediante PCR a tiempo real, utilizando las parejas de cebadores, correspondientes a los genes codificadores de la β-tubulina, P450 y PKS, indicadas en la Tabla 2.6, para *A. carbonarius*. Todos los cebadores descritos en esta tabla se diseñaron y seleccionaron mediante el programa Primer Express (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Para el diseño de los cebadores del gen de la β-tubulina (gen *tub2*), se empleó la secuencia del GenBank de *A. carbonarius* AY585532 (De Vries *et al.*, 2005), previamente alineada, para comprobar su especificidad, con otras secuencias, del GenBank, del mismo gen de *A. carbonarius*: AY819997, AY819995 y AY819994. Para el diseño de los cebadores del gen de la poliquétido sintasa *AckS9* de *A. carbonarius* (Atoui *et al.*, 2006) se utilizó su secuencia obtenida del GenBank (AY540944). Como en el caso anterior, se alineó con otras secuencias para comprobar la especificidad de amplificación, concretamente con las de los números de acceso AY540952, AY652734, DQ128160, DQ128161 y AM944567, correspondientes a otros genes *pks* de *A. carbonarius*. En el caso del gen *p450*, para la elaboración de cebadores se empleó la secuencia de 270 pb del gen denominado *acarp450*, obtenido mediante PCR con cebadores degenerados como se describe en el Apartado 7.2 de "Material y Métodos". El alineamiento nucleotídico previo se realizó con genes *p450* de las especies *A. niger* (XP\_001396344), *A. fumigatus* (XP\_748206), *A. nidulans* (XP\_659398), *A. oryzae* (XP\_001817189), *A. flavus* (AAS89997), *A. nomius* (AAS90045), *A. parasiticus* (AAS66021), *F. cerealis* (AAM48764) y *F. culmorum* (AAM49028).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real "ABI PRISM 7900" (Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizando la mezcla maestra "SYBR® Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems, Estados Unidos). Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con los siguientes elementos: 10 µl de la mezcla maestra, 3 µl de agua Mili-Q, 1 µl de cada cebador 5 µM (siendo su concentración final 250 nM) y 5 µl de cDNA. Las condiciones térmicas de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Gen amplificado	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
β-tubulina ( <i>tub2</i> )	βTUB CAR F	CTGGAGCGCATGAACGTCTA	57
	βTUB CAR R	CAAGGACGGCAGGAGGAA	
Monooxigenasa citocromo P450 ( <i>acarp450</i> )	QPCR p450 F	CTCGTGTACAAAACCTGGACCAT	64
	QPCR p450 R	GGAGACGGAGTAGTTATCCATGCT	
Poliquétido sintasa ( <i>AckS9</i> )	PKS CAR F	TCATCTGGAACGGCAGCAT	59
	PKS CAR R	TGCCAGTCAAAAAAGAAGGAAAC	

**Tabla 2.6.** Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR a tiempo real en *A. carbonarius*.

## 10. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON FUNGICIDAS

Los hongos se cultivaron en los medios sólidos CYA (pH 6,0) y YES (pH 8,3), de la forma descrita en el Apartado 8 de "Material y Métodos", como condiciones permisivas y restrictivas para la producción de OTA, pero añadiendo al medio diferentes concentraciones de los fungicidas que aparecen reflejados en la Tabla 2.7.

COMPUESTO	TIPO	CASA COMERCIAL
Mancozeb	Fungicida polivalente de amplio espectro	River, España
Benomilo (Benoprón)	Fungicida sistémico de amplio espectro	Probelte, España
Cola de caballo ( <i>Equisetum arvense</i> L.)	Fungicida ecológico	Trabe, España

**Tabla 2.7.** Fungicidas añadidos al medio de cultivo, tipo y marca comercial.

Todos los compuestos se añadieron a partir de soluciones *stock* elaboradas con agua destilada estéril, tras el autoclavado del medio y antes de su dispensado en placas Petri, cuando el medio descendió hasta una temperatura de 50°C aproximadamente. Las placas se inocularon con las cepas de *A. carbonarius* 325 y 168, tras la adición de celofanes estériles como se describe en el Apartado 8 de "Material y Métodos", y se realizó depositando 2 µl de una suspensión de 10<sup>6</sup> esporas/ml (ver preparación en el Apartado 2 de "Material y Métodos"), en el centro de las mismas, en condiciones de esterilidad. La incubación se llevó a cabo en estufa a 28°C para ambos medios, durante 5 y 7 días. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada cepa.

Una vez finalizado el período de incubación, el micelio se separó retirando el celofán de las placas, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta el momento de su análisis. La extracción de RNA total, transcripción inversa y reacciones de RT-PCR a tiempo real se realizaron como se describe en el Apartado 9 de "Material y Métodos".

## **11. CUANTIFICACIÓN DE OCRATOXINA A**

La extracción de OTA a partir de medios sólidos se realizó mediante el método desarrollado por Bragulat *et al.* (2001): se extrajeron tres discos de agar de 5 mm de diámetro del extremo, medio y centro de la zona de crecimiento del hongo, respectivamente. Los discos se introdujeron en tubos Eppendorf de 2 ml y se añadió 1 ml de metanol. Tras homogeneizar con vortex se dejaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se repitió la homogeneización con vortex y se filtraron a través de filtros de 45 µm (Millex HV 13 mm, Millipore Corporation, Estados Unidos). Los filtrados se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

La purificación y cuantificación de OTA se realizó en colaboración con Jorge Muñoz, del Departamento de Análisis Especiales del Laboratorio Arbitral Agroalimentario (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA) de Madrid. La purificación previa de OTA a partir de los filtrados anteriormente descritos se llevó a cabo mediante el empleo de columnas de inmunoafinidad Ochraprep® (R-Biopharm, Reino Unido) y, una vez purificados, se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cuantificación de OTA se realizó mediante HPLC siguiendo los protocolos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, 1996a y b), y mediante el empleo de una columna cromatográfica de fase inversa de octadecilsilano (ODS) de 250 mm x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Waters Corporation, Estados Unidos) a 45°C en un sistema (Waters 600) acoplado a un detector de fluorescencia (Waters 474) (Waters Corporation, Estados Unidos) de longitudes de onda de excitación y emisión de 330 y 470 nm respectivamente. La fase móvil empleada fue fosfato monopotásico 4mM pH 2,5 y metanol (33:67), a una tasa de flujo de 1 ml/min. La OTA fue cuantificada por comparación con una curva generada por diluciones estándar de OTA (OEKANAL<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Alemania).

Los valores de producción de OTA de hongos aislados de uvas (Tabla 3.4 de "Resultados"), fueron obtenidos en el Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, en colaboración con la Dra. Misericordia Jiménez, a partir de los aislamientos cultivados en medio líquido YES suplementado con polen de abeja al 5%, incubados a 25°C durante 28 días y filtrados a través de papel Whatman Nº 4 (Medina *et al.*, 2004). La purificación previa de OTA a partir de los filtrados se realizó añadiendo 200 µl de ácido fosfórico 0,1 M, 5 ml de cloroformo, y evaporando los extractos orgánicos a 40°C mediante un rotavapor, para resuspenderlos finalmente en 100 µl de la fase móvil utilizada en la cromatografía.

Una vez purificados, se cuantificaron mediante HPLC (Saéz *et al.*, 2004), con el empleo de una columna cromatográfica de fase inversa Li-Chrosper 100 C<sub>18</sub> de 250 mm x 4 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Waters Corporation, Estados Unidos) a 30°C, en un sistema (Waters 600) acoplado a un detector de fluorescencia (Waters 474) (Waters Corporation, Estados Unidos) de longitudes de onda de excitación y emisión de 333 y 460 nm respectivamente. La fase móvil empleada fue acetonitrilo-agua-ácido acético (99:99:2), a una tasa de flujo de 1 ml/min. La presencia de OTA fue cuantificada por comparación con una curva generada por diluciones estándar de OTA (OEKANAL<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Alemania).

# RESULTADOS

---



## 1. ENSAYOS DE PCR ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Aspergillus* TOXÍGENAS

El primer objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de ensayos de PCR que permitieran la detección de especies de *Aspergillus*, para su aplicación en matrices alimentarias que frecuentemente se contaminan con hongos de este género. Por ello, se diseñaron cebadores para ser utilizados en siete ensayos de PCR que permiten la identificación de las siguientes especies de *Aspergillus*: *A. carbonarius*, agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), *A. japonicus*, *A. heteromorphus* y *A. ellipticus* (Sección *Nigr*), *A. ochraceus* (Sección *Circumdati*) y *A. flavus* (Sección *Flavi*).

### 1.1. ENSAYOS DE PCR ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Aspergillus* PERTENECIENTES A LA SECCIÓN *Nigr*

La región genómica diana para la obtención de cebadores específicos fue la región ITS1-5,8S-ITS2. Para observar su variabilidad intraespecífica, se analizó la secuencia de varias cepas de distinto origen de cada una de las especies de *Aspergillus* incluidas en ese momento en la sección según diversos autores (Samson *et al.*, 1994; Pitt *et al.*, 2000): *A. carbonarius*, agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), *A. japonicus*, *A. heteromorphus* y *A. ellipticus*. Esto nos permitió obtener secuencias consenso para cada especie, en las que basar el diseño de cebadores. Además de las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio, las cuales aparecen en la Tabla 2.1 de "Material y Métodos", se emplearon otras disponibles en las bases de datos (GenBank), entre otras las de los números de acceso AJ280011 y AJ280012 (*A. carbonarius*), AJ280006 y AJ853742 (*A. niger*), AJ280008 y AJ280007 (*A. tubingensis*) y AJ280014 (*A. ellipticus*).

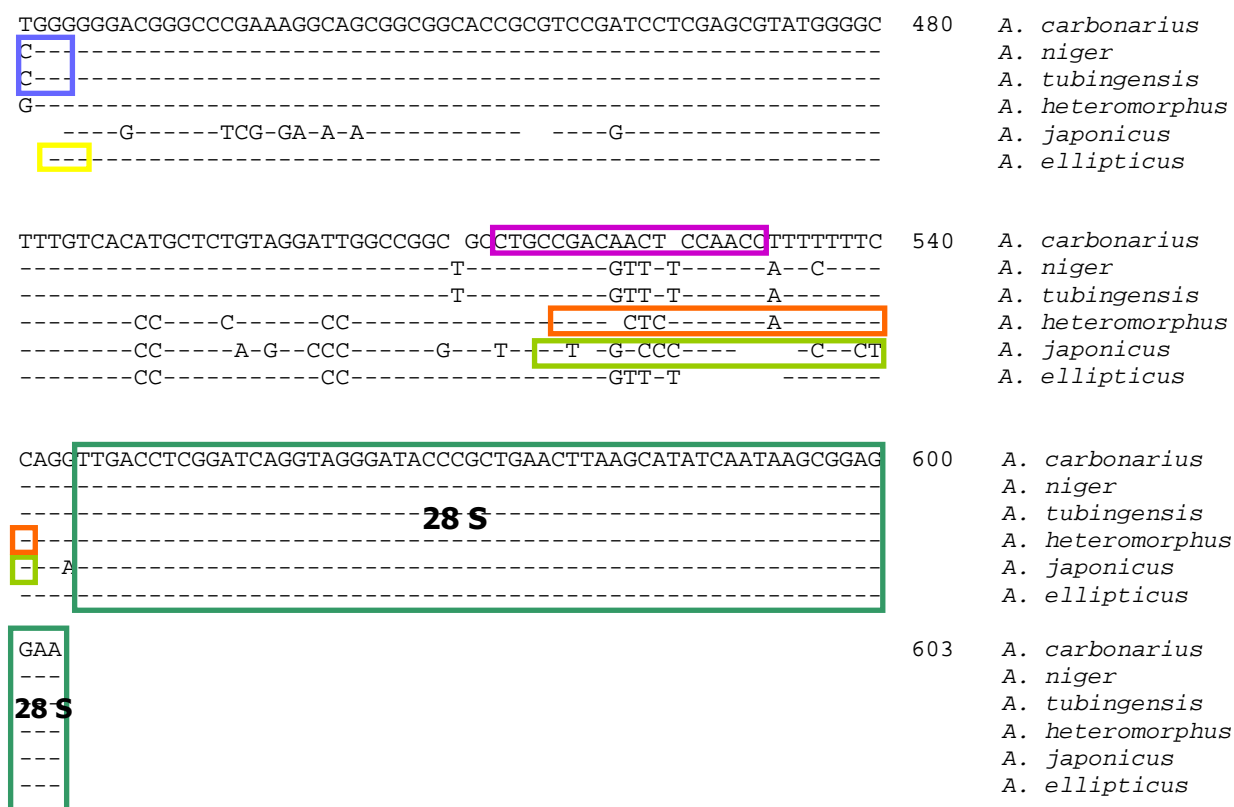
Para la obtención de las secuencias de ITS se emplearon los cebadores ITS1 e ITS4, descritos en el Apartado 3.3 de "Material y Métodos". El DNA amplificado se purificó y secuenció como se describe en los Apartados 3.6 y 3.7 de "Material y Métodos". En la Figura 3.1 se muestra el alineamiento de las secuencias de ITS1-5,8S-ITS2 de cepas representativas de las especies *A. carbonarius* (AJ876878), *A. niger* (AJ876876), *A. tubingensis* (AJ876877), *A. heteromorphus* (AJ876879), *A. japonicus* (AJ876880) y *A. ellipticus* (AJ876881), obtenidas en nuestro laboratorio e introducidas en la base de datos EMBL (ver Tabla 2.1 de "Material y Métodos").



## RESULTADOS

Los cebadores específicos CAR1-CAR2, NIG, JAP, ELL y HET (Tabla 2.2 y Figura 2.1 de "Material y Métodos"), fueron diseñados en base al alineamiento mencionado, y las zonas donde se encuentran no mostraron, en ningún caso, diferencias intraespecíficas en su secuencia. Los cebadores NIG, JAP, ELL y HET se utilizan en combinación con el cebador general de ITS en *Aspergillus*, ITS1.

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGG CCCAACCTC	60	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
<b>18 S</b>		
CCACCCGTGTCTATTGTACC TGTTCCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCCGGGG	120	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
GCATCTCTGCCCCCTCGG	180	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
ATCGTGAAGTCTGAGTCGATTGTTTTCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTG	240	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
<b>5,8 S</b>		
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCA	300	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
<b>5,8 S</b>		
GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTC	360	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCC CTGTC	420	<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. heteromorphus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. ellipticus</i>
<b>5,8 S</b>		



**Figura 3.1.** Alineamiento de la secuencia de la región ITS1-5,8S-ITS2 de seis cepas representativas de especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*: *A. carbonarius*, agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), *A. heteromorphus*, *A. japonicus* y *A. ellipticus*. Se muestran las posiciones de los cebadores CAR1/CAR2 (Recuadros rosas), ITS1 (Recuadro rojo), NIG (Recuadro azul), HET (Recuadro naranja), JAP (Recuadro verde claro) y ELL (Recuadro amarillo). Se señalan así mismo las posiciones de los genes del rDNA (Recuadros verdes).

Tras la optimización del ensayo y condiciones de PCR, la especificidad de los cebadores se comprobó con una muestra amplia de aislamientos de *Aspergillus* de uvas y cereales de diferentes orígenes geográficos y hospedadores, con cepas de colecciones de cultivo y con otros géneros que frecuentemente aparecen en los mismos sustratos (Tabla 3.1).

## RESULTADOS

AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	CAR	NIG	HET	JAP	ELL
CECT 2086		<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
242** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
207** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
168** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
229** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
171** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
173** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
178** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
190** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
168** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
350** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
325** (a)	España	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
MUM 04.01*** (a)	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
MUM 04.02*** (a)	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
MUM 04.03*** (a)	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	+	-	-	-	-
CECT 2091	Canadá	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
CECT 20157	Canadá	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
CECT 2574		<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
CECT 2775		<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
CECT 20156		<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
T.MV.A16 (a)	Zamora (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
C.AL.A37 (a)	Zamora (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
Z.MA.A29 (a)	Valladolid (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
B.ME.A28 (a)	León (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
Z.GA.A29 (a)	Valladolid (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
Z.MA.A27 (a)	Valladolid (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
B.ME.A26 (a)	León (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
T.TT.A6 (a)	Zamora (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
B.ME.A33 (a)	León (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
T.MV.A14 (a)	Zamora (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
B.ME.A34 (a)	León (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
Z.GA.A22 (a)	Valladolid (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
Z.GA.A23 (a)	Valladolid (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
B.ME.A30 (a)	León (Es)	<i>A. niger</i>	-	+	-	-	-
T.TT.A5 (a)	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
ZD.MF.ZD.A9 (a)	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
T.TT.A11 (a)	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
T.TT.A2 (a)	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
T.TT.A1 (a)	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
T.TT.A7 (a)	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 11	Bilbao (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 18 1	Burgos (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 19	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 20	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 20 1	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 20 2	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 20 3	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 21 5	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 21 9	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 22 1	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 22 2	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 22 4	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 22 18	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 23	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 23 3	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 23 17	Palencia (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 25 1	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 26 4	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 26 7	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 27 14	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 43	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-

AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	CAR	NIG	HET	JAP	ELL
TR 45 1	Burgos (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 45 2	Burgos (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 45 3	Burgos (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 55	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 55 1	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 55 2	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 55 3	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 58 1	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 58 2	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 58 3	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 58 6	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 58 9	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 62 2	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TR 62 6	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
CB 2.5 1	Treviño (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
CB 2.44 1	Logroño (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
CB 2.44 2	Logroño (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TB 2 1	Soria (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TB 2 3	Soria (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TB 3 1	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TB 3 2	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TB 5 1	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
TB 5 2	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
OTAI	Reino Unido	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
Asp Q (a)	Logroño (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
A1 (a)	Puerto Real (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
A2 (a)	Puerto Real (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
A3 (a)	Puerto Real (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
A4 (a)	Puerto Real (Es)	<i>A. tubingensis</i>	-	+	-	-	-
CBS 117.55	Brasil	<i>A. heteromorphus</i>	-	-	+	-	-
MUCL 13578		<i>A. japonicus</i>	-	-	-	+	-
ITEM 4158****(a)	Italia	<i>A. japonicus</i>	-	-	-	+	-
ITEM 4685****(a)	Portugal	<i>A. japonicus</i>	-	-	-	+	-
ITEM 4687****(a)	España	<i>A. japonicus</i>	-	-	-	+	-
MUCL 31303	Costa Rica	<i>A. ellipticus</i>	-	-	-	-	+
CBS 482.62	Costa Rica	<i>A. ellipticus</i>	-	-	-	-	+
CBS 707.79	Costa Rica	<i>A. ellipticus</i>	-	-	-	-	+
CBS 589.68*	Estados Unidos	<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-
CBS 263.67*	Sudáfrica	<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-
U-2003 (a)	Rioja (Es)	<i>A. westerdijkiae</i>	-	-	-	-	-
CECT 2092		<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-
CCT 6810* (b)	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-
CCT 6795* (b)	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	-
CL.1 (a)	Valladolid (Es)	<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-	-
UCO.1 (a)	Valladolid (Es)	<i>Alternaria consortiale</i>	-	-	-	-	-
BO.1 (a)	Valladolid (Es)	<i>Botrytis</i> sp.	-	-	-	-	-
CECT 2906		<i>Penicillium verrucosum</i>	-	-	-	-	-
T.MV.F.1 (a)	Valladolid (Es)	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-

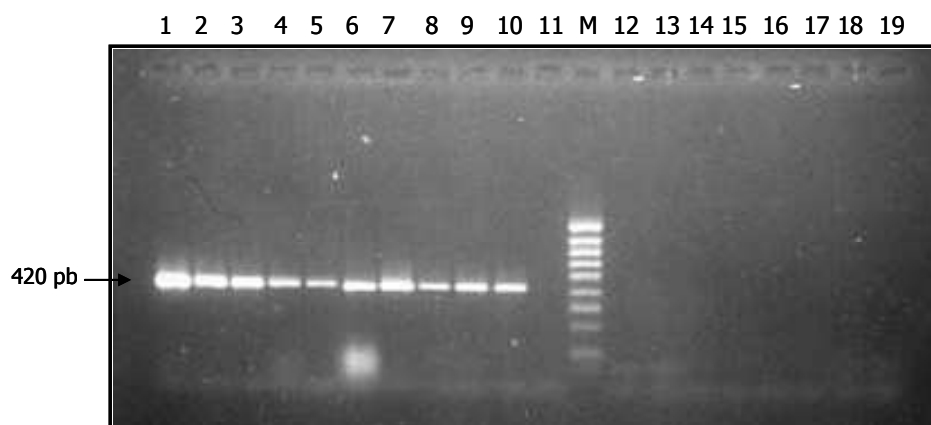
**Tabla 3.1.** Aislamientos y cepas analizados indicando el origen, la especie y el resultado de los ensayos específicos de PCR para la detección *A. carbonarius* (CAR), agregado *A. niger* (NIG); *A. heteromorphus* (HET), *A. japonicus* (JAP) y *A. ellipticus* (ELL). (\*) Cepas proporcionadas por el Dr. L. Niessen (Universidad de Munich, Alemania). (\*\*) Cepas proporcionadas por el Dr. V. Sanchis (Universidad de Lleida, España). (\*\*\*) Cepas proporcionadas por el Dr. A. Venancio (Universidad de Minho, Portugal). (\*\*\*\*) Cepas proporcionadas por el Dr. A. Moretti (CNR, Bari, Italia). (a): Cepas aisladas de diferentes variedades de uvas, (b): Cepas aisladas de café, TR: cepas aisladas de trigo duro, CB: Cepas aisladas de cebada, TB: Cepas aisladas de trigo blando.

En todos los casos y en las condiciones descritas, las reacciones de PCR específicas para cada una de las especies señaladas dieron lugar a un fragmento único de la longitud esperada (Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6). Las cuatro especies de *Aspergillus* y las especies pertenecientes al agregado *A. niger*, objeto de este estudio, pueden ser diferenciadas unas de otras, así como de otras especies de *Aspergillus*, con la correspondiente reacción de PCR.

El protocolo específico de PCR diseñado para *A. carbonarius*, *A. ellipticus* y aislamientos del agregado *A. niger* amplificó un fragmento de unos 420 pb, mientras que los fragmentos amplificados en las especies *A. japonicus* y *A. heteromorphus* fueron de 520 pb y 540 pb, respectivamente.



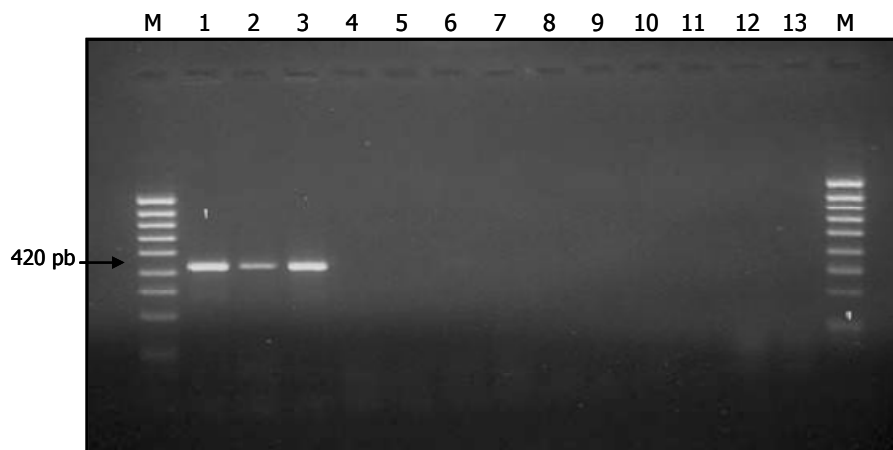
**Figura 3.2.** Amplificación mediante PCR con los cebadores CAR1/CAR2 y DNA de aislamientos de *Aspergillus carbonarius*. Carriles 1-10: CECT 2086, 242, 207, 171, 173, 178, 190, 168, MUM 04.01, MUM 04.02, carril 11: Control negativo, carriles 12-14: *A. niger* (CECT 2091, 2574 y 2775, respectivamente), carriles 15-16: *A. ochraceus* (CBS 589.68 y CECT 2092, respectivamente), carril 17: *Penicillium verrucosum* (CECT 2906), carril 18: *Cladosporium* sp. (CL.1) y carril 19: *Alternaria consortiale* (UCO.1). M: Marcador de bajo peso molecular Real Escala nº 2.



**Figura 3.3.** Amplificación mediante PCR con los cebadores ITS1/NIG y DNA de aislamientos de *Aspergillus* del agregado *A. niger*. Carriles 1-10: Z.GA.A23, CECT 2091, CECT 2775, B.ME.A30, CECT 20156, T.TT.A5, T.TT.A11, T.TT.A2, T.TT.A7, T.TT.A1, carril 11: Control negativo, carriles 12-14: *A. ochraceus* (CCT 6810, CCT 6710 y CBS 589.68, respectivamente), carriles 15-17: *A. carbonarius* (CECT 2086, 207 y MUM04.01 respectivamente), carril 18: *Alternaria consortiale* (UCO.1) y carril 19: *Cladosporium* sp. (CL.1). M: Marcador de bajo peso molecular Real Escala nº 2.



**Figura 3.4.** Amplificación mediante PCR con los cebadores ITS1/JAP y DNA de aislamientos de *Aspergillus japonicus*. Carriles 1-4: MUCL 13578, ITEM 4158, ITEM 4685, ITEM 4687, carriles 5-9: *Aspergillus* sección *Nigri*: *A. niger* (CECT 2574), *A. tubingensis* (OTAI), *A. carbonarius* (229), *A. heteromorphus* (CBS 117.55) y *A. ellipticus* (MUCL 31303) respectivamente, carril 10: *A. ochraceus* (CBS 589.68), carril 11: *Penicillium verrucosum* (CECT 2906), carril 12: *Cladosporium* sp. (CL.1) y carril 13: *Alternaria consortiale* (UCO.1), carril 14: Control negativo. M: Marcadores de bajo peso molecular Real Escala nº 2.

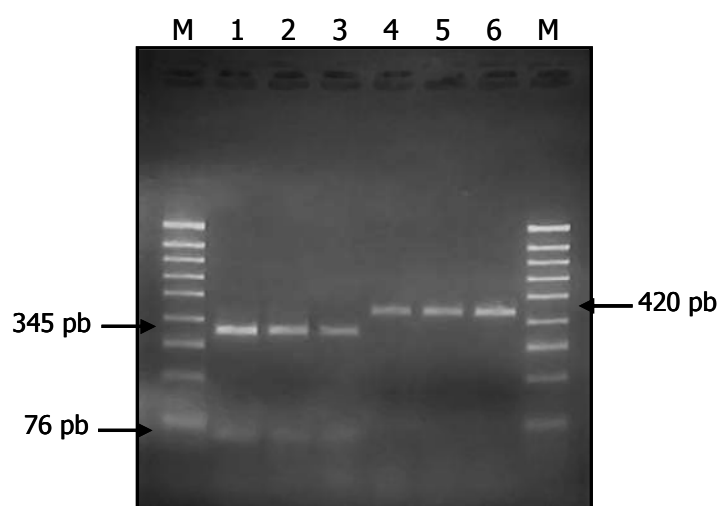


**Figura 3.5.** Amplificación mediante PCR con los cebadores ITS1/ELL y DNA de aislamientos de *Aspergillus ellipticus*. Carriles 1-3: MUCL 31303, CBS 707.79, CBS 482.62, carriles 4-8: *Aspergillus* sección *Nigri*: *A. niger* (CECT 2574), *A. tubingensis* (OTAI), *A. carbonarius* (229), *A. heteromorphus* (CBS 117.55) y *A. japonicus* (MUCL 13578) respectivamente, carril 9: *A. ochraceus* (CBS 589.68), carril 10: *Penicillium verrucosum* (CECT 2906), carril 11: *Cladosporium* sp. (CL.1) y carril 12: *Alternaria consortiale* (UCO.1), carril 13: Control negativo. M: Marcadores de bajo peso molecular Real Escala nº 2.



**Figura 3.6.** Amplificación mediante PCR con los cebadores ITS1/HET y DNA de *Aspergillus heteromorphus*. Carril 1: CBS 117.55, carriles 2-6: *Aspergillus* sección *Nigri*: *A. niger* (CECT 2574), *A. tubingensis* (OTAI), *A. carbonarius* (168), *A. japonicus* (MUCL 13578) y *A. ellipticus* (MUCL 31303) respectivamente, carril 7: *A. ochraceus* (CECT 2969), carril 8: *Penicillium verrucosum* (CECT 2906), carril 9: *Cladosporium* sp. (CL.1) y carril 10: *Alternaria consortiale* (UCO.1), carril 11: Control negativo. M: Marcadores de bajo peso molecular Real Escala nº 2.

La secuencia de la región ITS1-5,8S-ITS2 de las especies del agregado *A. niger*, *A. niger* y *A. tubingensis*, sólo difiere en tres nucleótidos. Uno de esos nucleótidos, localizado en la posición +45 de la secuencia de ITS1 de *A. niger* CECT 2091, afecta a la diana de la endonucleasa de restricción *Rsa* I (Accensi *et al.*, 1999). La utilización del cebador ITS1 permite que en el fragmento amplificado quede incluida dicha diana de *Rsa* I. Los fragmentos amplificados con los cebadores ITS1/NIG se digirieron con la enzima de restricción *Afa* I (*Rsa* I), con diana de cuatro pares de bases o corte frecuente, originando dos fragmentos de unos 345 pb y 76 pb respectivamente en el caso de *A. niger*, y un único fragmento de unos 420 pb en el caso de *A. tubingensis*, como puede apreciarse en la Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Digestión con la enzima *Afa* I de amplificaciones de la región ITS de DNA de *Aspergillus* del agregado *A. niger*. Carriles 1-3: *Aspergillus niger* (CECT 2775, B.ME.A30 y Z.MA.A29 respectivamente), carriles 4-6: *Aspergillus tubingensis* (T.TT.A5, T.TT.A2 y OTAI respectivamente). M: Marcadores de bajo peso molecular Real Escala nº 2.

### 1.2. ENSAYO DE PCR ESPECÍFICO PARA *Aspergillus ochraceus*

Se ha diseñado un ensayo de PCR para *A. ochraceus*, la especie de *Aspergillus* de la sección *Circumdati* que más frecuentemente aparece como contaminante en alimentos.

Los cebadores OCRA1 y OCRA2 (Tabla 2.2 y Figura 2.1 de "Material y Métodos") se diseñaron en base a la comparación y alineamiento de la secuencia de DNA de la región ITS1-5,8S-ITS2 en varios aislamientos de especies de *Aspergillus*.



## RESULTADOS

Las secuencias de *A. ochraceus* obtenidas en nuestro laboratorio, y empleadas para el diseño de los cebadores, aparecen en la Tabla 2.1 de "Material y Métodos".

Al inicio de esta tesis, aún no habían sido descritas las nuevas especies de la sección *Circumdati* que se conocen en la actualidad, y prácticamente la única especie aislada como contaminante de alimentos y semillas era *A. ochraceus*. Posteriormente, se comprobó la especificidad de nuestros cebadores frente a la secuencia de la región ITS de otras especies de *Aspergillus* de la sección *Circumdati* descritas, como la importante productora de OTA *A. steynii*, y frente a la también importante, aunque menos toxígena, *A. elegans*. Sin embargo, la secuencia completa de la región ITS de *A. westerdijkiae* es muy similar a la de *A. ochraceus*, y no podrían ser distinguidas mediante éste ensayo.

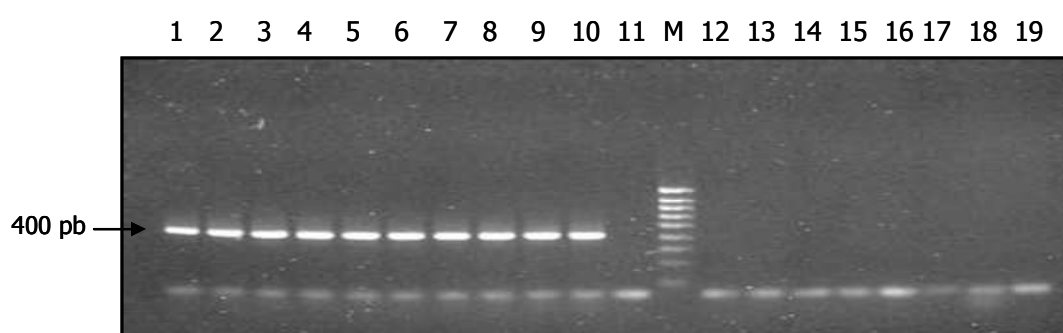
La especificidad de los cebadores se ha comprobado con una muestra amplia de aislamientos de *Aspergillus* de diferentes orígenes geográficos y hospedadores, con cepas de colecciones de cultivo y con otros géneros que frecuentemente aparecen en los mismos sustratos (Tabla 3.2).

AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	HOSPEDADOR	OCRA
CBS 589.68*	Estados Unidos	<i>A. ochraceus</i>		+
CBS 263.67*	Sudáfrica	<i>A. ochraceus</i>		+
CBS 588.68*	Estados Unidos	<i>A. ochraceus</i>		+
NRL 3471		<i>A. ochraceus</i>		+
U-2003	Rioja (Es)	<i>A. westerdijkiae</i>	Uva	+
AL F		<i>A. westerdijkiae</i>		+
AL D		<i>A. westerdijkiae</i>		+
CECT 2092		<i>A. ochraceus</i>		+
CECT 2093		<i>A. ochraceus</i>		+
CECT 2948		<i>A. ochraceus</i>		+
CECT 2969		<i>A. ochraceus</i>		+
CECT 2970		<i>A. ochraceus</i>		+
CCT 6810*	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	Café	+
CCT 6795*	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	Café	+
CCT 6790*	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	Café	+
CCT 6825*	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	Café	+
CCT 6780*	Brasil	<i>A. ochraceus</i>	Café	+
Aso2****		<i>A. steynii</i>		-
CBS 112812		<i>A. steynii</i>		-
CBS 112813		<i>A. steynii</i>		-
CBS 112814		<i>A. steynii</i>		-
CBS 121991		<i>A. steynii</i>		-
CBS 121993		<i>A. steynii</i>		-
CBS 102.14		<i>A. elegans</i>		-
CBS 310.80		<i>A. elegans</i>		-
CBS 614.78		<i>A. elegans</i>		-
CBS 615.78		<i>A. elegans</i>		-
IMI 345568		<i>A. elegans</i>		-
IMI 345571		<i>A. elegans</i>		-

AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	HOSPEDADOR	OCRA
171***	España	<i>A. carbonarius</i>	Uva	-
MUM 04.01****	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	Uva	-
CECT 2091	Canadá	<i>A. niger</i>		-
CECT 20157	Canadá	<i>A. niger</i>		-
CECT 2574		<i>A. niger</i>		-
CECT 2775		<i>A. niger</i>		-
T.TT.A5	Zamora (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Uva	-
ZD.MF.ZD.A9	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Uva	-
TR 19	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Trigo duro	-
TR 20	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Trigo duro	-
TB 2 1	Soria (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Trigo blando	-
ITEM 4687**	España	<i>A. japonicus</i>		-
MUCL 31303	Costa Rica	<i>A. ellipticus</i>		-
UCO.1	Valladolid (Es)	<i>Alternaria consortiale</i>	Uva	-
BO.1	Valladolid (Es)	<i>Botrytis</i> sp.	Uva	-
CL.1	Valladolid (Es)	<i>Cladosporium</i> sp.	Uva	-
CECT 2906		<i>Penicillium verrucosum</i>		-
T.MV.F.1	Valladolid (Es)	<i>Fusarium</i> sp.	Uva	-

**Tabla 3.2.** Aislamientos y cepas analizados indicando el origen, la especie, el hospedador y el resultado de los ensayos específicos de PCR para la detección *A. ochraceus* (OCRA). (\*) Cepas proporcionadas por el Dr. L. Niessen (Universidad de Munich, Alemania). (\*\*) Cepa proporcionada por el Dr. A. Moretti (CNR, Bari, Italia). (\*\*\*) Cepa proporcionada por el Dr. V. Sanchis (Universidad de Lleida, España). (\*\*\*\*) Cepa proporcionada por el Dr. A. Venancio (Universidad de Minho, Portugal). (\*\*\*\*\*) Cepa proporcionada por la Dra. M. Jiménez (Universidad de Valencia).

El protocolo específico de PCR diseñado para *A. ochraceus* amplificó un único fragmento de unos 400 pb, sólo en las muestras que contenían DNA de ésta especie (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Amplificación mediante PCR con los cebadores OCRA1/OCRA2 y DNA de aislamientos de *Aspergillus ochraceus*. Carriles 1-10: CBS 589.68, CBS 263.67, NRLL 3741, CECT 2093, CECT 2092, CECT 2948, CECT 2970, CCT 6810, CCT 6795, CCT 6810, carril 11: Control negativo, carriles 12-14: *A. niger* (CECT 2091, 2574 y 2775, respectivamente), carriles 15-16: *A. carbonarius* (171 y MUM 04.01, respectivamente), carril 17: *Penicillium verrucosum* (CECT 2906); Carril 18: *Cladosporium* sp. (CL.1) y carril 19: *Alternaria consortiale* (UCO.1). M: Marcador de bajo peso molecular Real Escala nº 2.

### 1.3. ENSAYO DE PCR ESPECÍFICO PARA *Aspergillus flavus*

Debido a que una de las matrices alimentarias que se analizan posteriormente son cereales, y *Aspergillus flavus* es una de las principales especies contaminantes de harinas, se diseñó una pareja de cebadores, FLA1 y FLA2 (Tabla 2.2 y Figura 2.1 de "Material y Métodos"), para la detección de dicha especie.

Como los casos anteriores, los cebadores se diseñaron en base a la comparación y alineamiento de la secuencia de DNA de la región ITS1-5,8S-ITS2 en varios aislamientos de especies de *Aspergillus* obtenidos en nuestro laboratorio (Tabla 3.7 de "Material y Métodos"). El alineamiento se efectuó además con especies de la sección *Flavi*, a la que pertenece *A. flavus*, disponibles en las bases de datos (GenBank), entre otras las de los números de acceso AJ871014, AJ853764, AJ853743, AJ874128, AB000532, AB074992 y AF078894 de *A. flavus*, D84356, AB074996, AB074995 y AB008418 de *A. parasiticus*, AB074997 y D84354 de *A. nomius* y AB106339 y EF121336 de *A. tamaraii*.

Tras la puesta a punto del protocolo que se describe en el Apartado 3.9 de "Material y Métodos", la especificidad del ensayo fue evaluada en diferentes aislamientos de *A. flavus*, frente a otras especies de la sección *Flavi* y otros géneros normalmente contaminantes de cereales, todos ellos procedentes de diversos hospedadores y orígenes geográficos (Tabla 3.3).

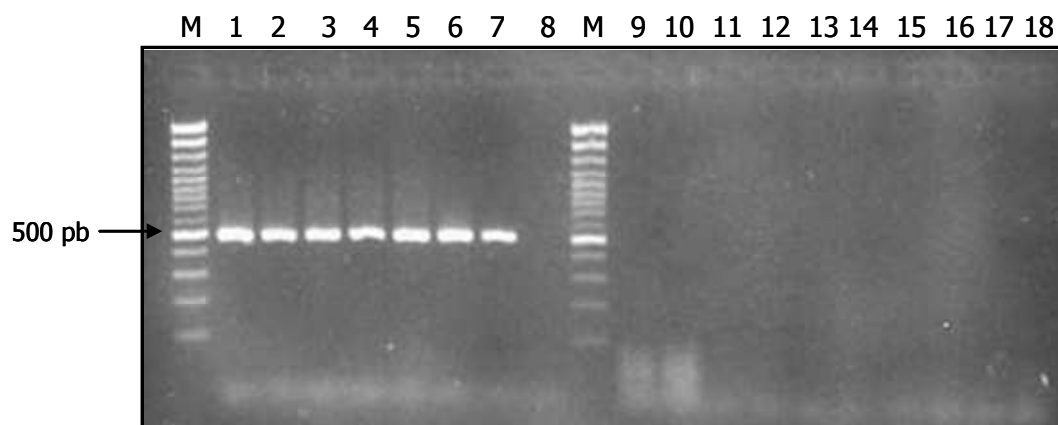
AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	HOSPEDADOR	FLA
M1hip6***	Madrid (Es)	<i>A. flavus</i>	Cebada	+
M12hip10***		<i>A. flavus</i>	Cebada	+
M2hip10***	Sevilla (Es)	<i>A. flavus</i>	Cebada	+
CECT 2681		<i>A. flavus</i>		+
ITEM 5135**	Italia	<i>A. flavus</i>	Harina	+
ITEM 4592**	Francia	<i>A. flavus</i>	Trigo	+
ITEM 4591**	Francia	<i>A. flavus</i>	Trigo	+
ATCC 20043		<i>A. flavus</i>	Suelo	+
NRRL 453 <sup>T</sup>		<i>A. flavus</i>	Nuez	+
NRRL 1957		<i>A. flavus</i>		+
JMC 12721		<i>A. flavus</i>	Algodón	+
IHEM 16077	Bélgica	<i>A. tamaraii</i>	Pan	-
M6hip1***	Albacete (Es)	<i>A. tamaraii</i>	Pan	-
IHEM 19289	Japón	<i>A. bombycis</i>		-
IHEM 18041	Guayana Francesa	<i>A. nomius</i>	Mango	-
Cab5dch6	Albacete (Es)	<i>A. parasiticus</i>	Cebada	-
NRRL 502 <sup>T</sup>		<i>A. parasiticus</i>		-

AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	HOSPEDADOR	FLA
NRRL 465		<i>A. parasiticus</i>		-
ATCC 56775		<i>A. parasiticus</i>		-
ATCC 22789		<i>A. parasiticus</i>		-
ATCC 15517 <sup>R</sup>		<i>A. parasiticus</i>		-
ATCC 22789		<i>A. parasiticus</i>		-
C31	Valladolid (Es)	<i>A. ustus</i>	Cebada	-
C32	Valladolid (Es)	<i>A. ustus</i>	Cebada	-
T.TT.A.13	Zamora (Es)	<i>A. fumigatus</i>	Uva	-
R.T.A.16	Valladolid (Es)	<i>A. fumigatus</i>	Uva	-
CECT 2808		<i>A. terreus</i>		-
CECT 2907		<i>A. awamori</i>		-
CECT 2903		<i>A. versicolor</i>		-
CECT 2546		<i>A. sclerotiorum</i>		-
CECT 2091	Canada	<i>A. niger</i>		-
CECT 2574		<i>A. niger</i>		-
TR 20 1	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Trigo duro	-
TB 2 1	Soria (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Trigo blando	-
TB 5 2	Valladolid (Es)	<i>A. tubingensis</i>	Trigo blando	-
350*	España	<i>A. carbonarius</i>	Uva	-
190*	España	<i>A. carbonarius</i>	Uva	-
CECT 2086		<i>A. carbonarius</i>		-
ITEM 4158**	Italia	<i>A. japonicus</i>	Uva	-
ITEM 4685**	Portugal	<i>A. japonicus</i>	Uva	-
CECT 2092		<i>A. ochraceus</i>		-
CECT 2948		<i>A. ochraceus</i>		-
CECT 2093		<i>A. ochraceus</i>		-
CL.1	Valladolid (Es)	<i>Cladosporium</i> sp.	Uva	-
CECT 2906		<i>P. verrucosum</i>		-

**Tabla 3.3.** Aislamientos analizados indicando el origen, la especie, el hospedador y el resultado en los ensayos específicos de PCR para la identificación de *A. flavus* (FLA).

(\*) Cepas proporcionadas por el Dr. V. Sanchis (Universidad de Lleida, España). (\*\*) Cepas proporcionadas por el Dr. A. Moretti (CNR, Bari, Italia). (\*\*\*) Cepas proporcionadas por la Dra. M. Jiménez (Universidad de Valencia).

Los cebadores seleccionados amplificaron un fragmento de unos 500 pb en la respectiva reacción de PCR, únicamente en aislamientos de *A. flavus* (Figura 3.9). No se observó amplificación en otras especies de la sección *Flavi* (*A. tamarii*, *A. nomius*, *A. bombycis* y *A. parasiticus*) o en otras especies más alejadas filogenéticamente (como *A. ochraceus* o *Aspergillus* de la sección *Nigri*). Tampoco se detectó amplificación cuando se utilizó DNA genómico de aislamientos de otras especies que no se incluyen en el género *Aspergillus*.



**Figura 3.9.** Amplificación mediante PCR con los cebadores FLA1/FLA2 y DNA de *Aspergillus flavus*. Carriles 1-7: CECT 2681, ITEM 4591, ITEM 4592, ITEM 5135, M2hip10, M1hip6, M12hip10, carril 8: Control negativo, carril 9: *A. parasiticus* Cab5dch6, carril 10: *A. tamarii* IHEM 16077, carril 11: *A. bombycis* IHEM 19289, carril 12: *A. ochraceus* CECT 2092, carril 13: *A. nomius* IHEM 18041, carril 14: *A. carbonarius* (CECT 2086), carril 15: *A. niger* (CECT 2091), carril 16: *A. tubingensis* (TR 20 1), carril 17: *Penicillium verrucosum* (CECT 2906), carril 18: *Cladosporium* sp. (CL.1). M: Marcador de peso molecular Ladder Plus de 100 pb.

## 2. APLICACIÓN DE LOS ENSAYOS DE PCR DESARROLLADOS

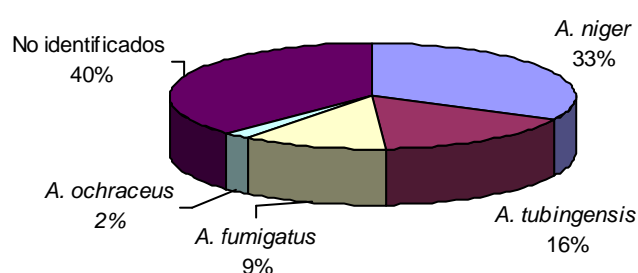
### 2.1. ANÁLISIS DE HONGOS AISLADOS DE UVAS DE VINO DE LAS COMUNIDADES DE CASTILLA-LEÓN Y LA RIOJA

Tras la recogida de uvas de vino de las Comunidades Autónomas de Castilla y León y La Rioja, y el aislamiento e identificación inicial de hongos mediante características morfológicas, como se describe en el Apartado 4 de "Material y Métodos", se procedió a la identificación mediante PCR de las diferentes especies de *Aspergillus* productoras de OTA que más frecuentemente se encuentran como contaminantes en uvas (*A. ochraceus*, *A. carbonarius* y agregado *A. niger*), como así mismo se describe en el Apartado 1 de "Resultados". Se analizaron un total de 51 aislamientos fúngicos, de los que también se comprobó, en los casos oportunos, la producción de OTA (Apartado 11 de "Material y Métodos"). Las localidades de estudio se indican en la Figura 2.2 de "Material y Métodos" y en la siguiente tabla (Tabla 3.4).

AISLAMIENTO	ORIGEN	VARIEDAD	ESPECIE	OCRA	CAR	NIG	OTA ng/ml
T.TT.A5	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	Trazas
ZD.MF.ZD.A9	Valladolid	Malfar	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	-
T.TT.A11	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	Trazas
T.TT.A2	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	Trazas
T.TT.A1	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	-
T.TT.A7	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	Trazas
Asp Q	La Rioja	Garnacha	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	Trazas
T.MV.A16	Zamora	Malvasía	<i>A. niger</i>	-	-	+	Trazas
C.AL.A37	Zamora	Albillo	<i>A. niger</i>	-	-	+	-
Z.MA.A29	Valladolid	Macabeo	<i>A. niger</i>	-	-	+	28,11
B.ME.A28	León	Mencia	<i>A. niger</i>	-	-	+	Trazas
Z.GA.A29	Valladolid	Garnacha	<i>A. niger</i>	-	-	+	86,01
Z.MA.A27	Valladolid	Macabeo	<i>A. niger</i>	-	-	+	-
B.ME.A26	León	Mencia	<i>A. niger</i>	-	-	+	Trazas
T.TT.A6	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. niger</i>	-	-	+	Trazas
B.ME.A33	León	Mencia	<i>A. niger</i>	-	-	+	Trazas
T.MV.A14	Zamora	Malvasía	<i>A. niger</i>	-	-	+	-
B.ME.A34	León	Mencia	<i>A. niger</i>	-	-	+	-
Z.GA.A22	Valladolid	Garnacha	<i>A. niger</i>	-	-	+	-
Z.GA.A23	Valladolid	Garnacha	<i>A. niger</i>	-	-	+	-
B.ME.A30	León	Mencia	<i>A. niger</i>	-	-	+	Trazas
B.ME.A31	León	Mencia	-	-	-	-	-
B.ME.A32	León	Mencia	-	-	-	-	-
T.MV.A15	Zamora	Malvasía	-	-	-	-	-
T.MV.A17	Zamora	Malvasía	-	-	-	-	-
T.MV.A18	Zamora	Malvasía	-	-	-	-	-
T.MV.A21	Zamora	Malvasía	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	34,73
R.MP.A3	Valladolid	Verdejo	-	-	-	-	-
R.T.A16	Valladolid	Tempranillo	-	-	-	-	-
R.T.A35	Valladolid	Tempranillo	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	0,24
R.T.A36	Valladolid	Tempranillo	-	-	-	-	-
T.TT.A3	Zamora	Tinta de Toro	-	-	-	-	Trazas
T.TT.A4	Zamora	Tinta de Toro	-	-	-	-	-
T.TT.A8	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-
T.TT.A10	Zamora	Tinta de Toro	-	-	-	-	-
T.TT.A12	Zamora	Tinta de Toro	-	-	-	-	-
T.TT.A13	Zamora	Tinta de Toro	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-
T.TT.A18	Zamora	Tinta de Toro	-	-	-	-	-
C.AL.A27	Valladolid	Albillo	-	-	-	-	Trazas
Z.MA.A39	Valladolid	Macabeo	<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-
R.V.A38	Valladolid	Viura	-	-	-	-	-
ZD.PX.ZD.A7	Valladolid	Pedro Ximénez	-	-	-	-	-
U-2003	La Rioja	Garnacha	<i>A. ochraceus</i>	+	-	-	1,68
C.AL.P1	Valladolid	Albillo	<i>P. sclerotiorum</i>	-	-	-	-
L	La Rioja	Garnacha	<i>P. polonicum</i>	-	-	-	-
R.TE.P4	León	Tempranillo	<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-
B.ME.P13	León	Mencia	<i>P. expansum</i>	-	-	-	-
CL.1	Valladolid	Cabernet-sauvignon	<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	NA
UCO.1	Valladolid	Merlot	<i>Alternaria consortiale</i>	-	-	-	NA
T.MV.F1	Valladolid	Malvasía	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	NA
BO.1	Valladolid	Tempranillo	<i>Botrytis</i> sp.	-	-	-	NA

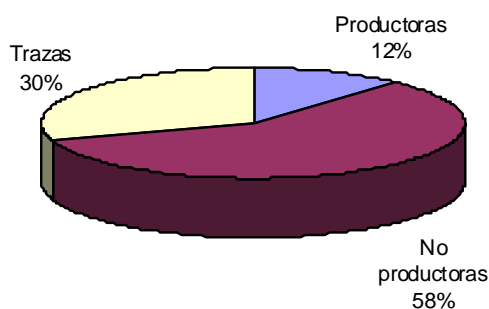
**Tabla 3.4.** Cepas de uvas de vino analizadas, origen, variedad de uva, especie, valores de producción de OTA y amplificación con los cebadores OCRA1/2 (OCRA), CAR1/2 (CAR) e ITS1/NIG (NIG). (-): no producción de OTA, NA: no analizados, trazas: OTA < 0,1 ng/ml.

Del total de 43 aislamientos de *Aspergillus* analizados, 7 fueron identificados como *A. tubingensis* (16%), 14 como *A. niger* (33%), ambas especies distinguidas mediante identificación molecular, un aislamiento fue identificado como *A. ochraceus* (2%) con ambos métodos tradicional y molecular, y 5 como *A. fumigatus* (9%), empleando identificación exclusivamente tradicional. El resto, 16 aislamientos, no están identificados (40%), pero no pertenecen a ninguna de las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* ni a *A. ochraceus*. En la Figura 3.10 se muestra el porcentaje de cada especie de *Aspergillus* en relación al total de aislamientos obtenidos.



**Figura 3.10.** Porcentaje de cada especie de *Aspergillus* en relación al total de aislamientos obtenidos.

Respecto a la producción de OTA, del total de aislamientos de *Aspergillus* analizados, 5 fueron productoras (12%) y 13 producían trazas de OTA ( $OTA < 0,1$  ng/ml) (30%), por lo que se detectó un total de 42% de cepas con capacidad ocratoxígena. 25 cepas fueron no productoras (58%). Los niveles de toxina producida se encontraron entre 0,24 y 86,01 ng/ml. En la Figura 3.11 se muestra el porcentaje de hongos productores de OTA en los aislamientos de *Aspergillus* estudiados.



**Figura 3.11.** Porcentaje de hongos productores y no productores de OTA en los aislamientos de *Aspergillus* estudiados.

Entre las especies de *Aspergillus* productoras de mayores cantidades de OTA, dos fueron *A. niger*, una *A. ochraceus* y dos *A. fumigatus*. No se observó asociación de la producción de OTA con una variedad de uva determinada o una localización geográfica concreta.

## 2.2. ANÁLISIS DE CEPAS DE *Aspergillus* EN CEBADA Y TRIGO BLANDO DE CASTILLA-LEÓN Y CASTILLA-LA MANCHA

Tras la recogida, en dos campañas consecutivas, de trigo blando y cebada de las Comunidades de Castilla-León y Castilla-La Mancha, se procesaron las muestras como se describe en el Apartado 5 de "Material y Métodos", y se diagnosticaron mediante ensayos de PCR las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA. Así mismo, se analizó *A. flavus* (ver protocolos en el Apartado 3 de "Material y Métodos"), debido a su ya mencionada importancia en cereales. Se analizaron un total de 53 muestras de cebada y 42 de trigo blando. La variedad y procedencia de las semillas analizadas se indican en la Tabla 2.3 y Figura 2.3 de "Material y Métodos". Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla 3.5.

MUESTRA	ORIGEN	VARIEDAD	AÑO	GRANO	FLA	OCR	CAR	NIG	JAP
CB 1	Albacete	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 2	Albacete	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
<b>CB 3</b>	Albacete	Hispanic	2006	Fresco	+	-	-	-	-
<b>CB 4</b>	Albacete	Cierzo	2006	Fresco	+	-	-	-	-
CB 5	Albacete	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 6	Albacete	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 7	Albacete	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 8	Albacete	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 9	Albacete	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 10	Albacete	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 11	Albacete	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 12	Albacete	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 13	Valladolid	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 14	Valladolid	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 15	Valladolid	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 16	Valladolid	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 17	Valladolid	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 18	Valladolid	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 19	Valladolid	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 20	Valladolid	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 21	Valladolid	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 22	Valladolid	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 23	Valladolid	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 24	Valladolid	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 25	Valladolid	Cerosa	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 26	Valladolid	Cerosa	2006	Fresco	-	-	-	-	-
<b>CB 27</b>	Valladolid	Cerosa	2006	Fresco	+	-	-	-	-



## RESULTADOS

MUESTRA	ORIGEN	VARIEDAD	AÑO	GRANO	FLA	OCR	CAR	NIG	JAP
<b>CB 28</b>	Burgos	Hispanic	2006	Fresco	+	-	-	-	-
CB 29	Burgos	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 30	Burgos	Hispanic	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 31	Burgos	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 32	Burgos	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
CB 33	Burgos	Cierzo	2006	Fresco	-	-	-	-	-
TR 1	Burgos	Marius	2006	Fresco	-	-	-	-	-
TR 2	Burgos	Isengrain	2006	Fresco	-	-	-	-	-
TR 3	Burgos	C. Argelino	2006	Fresco	-	-	-	-	-
<b>TR 4</b>	Burgos	Monbuey	2006	Fresco	+	-	-	-	-
TR 5	Burgos	Candeal	2006	Fresco	-	-	-	-	-
		Salamanca							
TR 6	Burgos	Candeal Nava	2006	Fresco	-	-	-	-	-
		del Rey							
TR 7	Burgos	Pané 247	2006	Fresco	-	-	-	-	-
<b>CB 34</b>	Valladolid	Cerosa	2006	Seco	+	-	-	-	-
<b>CB 35</b>	Valladolid	Cerosa	2006	Seco	-	-	-	+	-
CB 36	Valladolid	Cerosa	2006	Seco	-	-	-	-	-
<b>CB 37</b>	Valladolid	Hispanic	2006	Seco	-	-	-	+	-
<b>CB 38</b>	Valladolid	Cierzo	2006	Seco	+	-	+	+	-
<b>TR 8</b>	Burgos	Marius	2006	Seco	+	-	-	+	-
<b>TR 9</b>	Burgos	Isengrain	2006	Seco	+	-	-	-	-
TR 10	Burgos	C. Argelino	2006	Seco	-	-	-	-	-
<b>TR 11</b>	Burgos	Monbuey	2006	Seco	+	-	-	-	-
<b>TR 12</b>	Burgos	Candeal	2006	Seco	+	-	-	-	-
		Salamanca							
<b>TR 13</b>	Burgos	Candeal Nava	2006	Seco	+	-	-	-	-
		del Rey							
TR 14	Burgos	Pané 247	2006	Seco	-	-	-	-	-
CB 39	Valladolid	Hispanic	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 40	Valladolid	Hispanic	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 41	Valladolid	Hispanic	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 42	Valladolid	Cierzo	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 43	Valladolid	Cierzo	2007	Fresco	-	-	-	-	-
<b>CB 44</b>	Valladolid	Cierzo	2007	Fresco	-	-	+	-	-
<b>CB 45</b>	Valladolid	Cerosa	2007	Fresco	-	-	+	-	-
CB 46	Valladolid	Cerosa	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 47	Valladolid	Cerosa	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 48	Burgos	Hispanic	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 49	Burgos	Hispanic	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 50	Burgos	Hispanic	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 51	Burgos	Cierzo	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 52	Burgos	Cierzo	2007	Fresco	-	-	-	-	-
CB 53	Burgos	Cierzo	2007	Fresco	-	-	-	-	-
<b>TR 15</b>	Valladolid	Marius	2007	Fresco	-	-	+	-	-
TR 16	Valladolid	Isengrain	2007	Fresco	-	-	-	-	-
<b>TR 17</b>	Valladolid	C. Argelino	2007	Fresco	+	-	-	-	-
<b>TR 18</b>	Valladolid	Monbuey	2007	Fresco	+	-	-	-	-
<b>TR 19</b>	Valladolid	Candeal	2007	Fresco	+	-	-	-	-
		Salamanca							
<b>TR 20</b>	Valladolid	Candeal Nava	2007	Fresco	+	-	-	-	-
		de Rey							
<b>TR 21</b>	Valladolid	Pané 247	2007	Fresco	+	-	-	-	-
<b>TR 22</b>	Burgos	Marius	2007	Fresco	+	-	-	-	-
<b>TR 23</b>	Burgos	Isengrain	2007	Fresco	+	-	-	-	-
TR 24	Burgos	C. Argelino	2007	Fresco	-	-	-	-	-
<b>TR 25</b>	Burgos	Monbuey	2007	Fresco	+	-	-	-	-
TR 26	Burgos	Candeal	2007	Fresco	-	-	-	-	-
		Salamanca							
<b>TR 27</b>	Burgos	Candeal Nava	2007	Fresco	+	-	-	-	-
		del Rey							

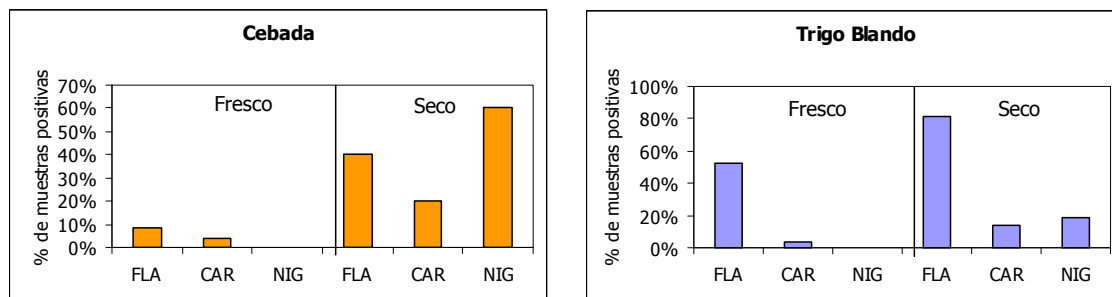
MUESTRA	ORIGEN	VARIEDAD	AÑO	GRANO	FLA	OCR	CAR	NIG	JAP
TR 28	Burgos	Pané 247	2007	Fresco	+	-	-	-	-
TR 29	Valladolid	Marius	2007	Seco	+	-	-	-	-
TR 30	Valladolid	Isengrain	2007	Seco	+	-	-	-	-
TR 31	Valladolid	C. Argelino	2007	Seco	+	-	-	+	-
TR 32	Valladolid	Monbuey	2007	Seco	+	-	+	-	-
TR 33	Valladolid	Candeal Salamanca	2007	Seco	-	-	-	-	-
TR 34	Valladolid	Candeal Nava del Rey	2007	Seco	+	-	-	-	-
TR 35	Valladolid	Pané 247	2007	Seco	+	-	-	+	-
TR 36	Burgos	Marius	2007	Seco	-	-	-	-	-
TR 37	Burgos	Isengrain	2007	Seco	+	-	-	-	-
TR 38	Burgos	C. Argelino	2007	Seco	+	-	-	+	-
TR 39	Burgos	Monbuey	2007	Seco	+	-	-	-	-
TR 40	Burgos	Candeal Salamanca	2007	Seco	+	-	-	-	-
TR 41	Burgos	Candeal Nava del Rey	2007	Seco	+	-	+	-	-
TR 42	Burgos	Pané 247	2007	Seco	+	-	-	-	-

**Tabla 3.5.** Muestras de trigo blando (TR) y cebada (CB) de Castilla-León y Castilla-La Mancha analizadas, indicando la localización de la muestra, la variedad, el año, el tipo de grano y el resultado en los ensayos específicos de PCR para la identificación de las especies *A. flavus* (FLA), *A. ochraceus* (OCR), *A. carbonarius* (CAR), agregado *A. niger* (NIG) y *A. japonicus* (JAP). C. Argelino: Candeal Argelino.

Los datos de ambos años en conjunto muestran que, en el caso de muestras frescas, la contaminación con las especies de *Aspergillus* analizadas no fue elevada. Así, un 26% de muestras estaban contaminadas con alguna de especie de *Aspergillus*. La especie mayoritaria fue *A. flavus*, que en el caso de las muestras de cebada alcanzó un 8,3% de muestras positivas, mientras que en trigo la contaminación fue mucho más patente, con un 52,38%. La otra especie hallada en muestras frescas fue *A. carbonarius* (4% de muestras positivas en cebada y en trigo).

Para muestras secas, se detectaron valores de contaminación más elevados con las especies del género *Aspergillus* estudiadas: un 81% de muestras poseían algún tipo de contaminación, con la aparición de especies no detectadas previamente en muestras frescas. Nuevamente dominó *A. flavus*, con un 81% de muestras positivas para esta especie en trigo. La contaminación con *A. carbonarius* supuso un 14,3% en el mismo cereal. Además, el agregado *A. niger* apareció en un 19% de las muestras de trigo blando. En muestras de cebada se detectó contaminación con las mismas especies: *A. flavus*, *A. carbonarius* y aparición del agregado *A. niger*.

En la Figura 3.12 se puede observar el porcentaje de muestras contaminadas en cebada y trigo blando con cada especie de *Aspergillus* descrita para muestras frescas y secas de ambos años. Se observa el aumento de contaminación tras el periodo de recolección y almacenaje de las semillas.



**Figura 3.12.** Porcentaje de muestras de cebada y trigo blando positivas a los ensayos de PCR para *A. flavus* (FLA), *A. carbonarius* (CAR) y agregado *A. niger* (NIG) en semillas frescas y secas, respectivamente, y para el total de muestras de ambos años.

La comparación de los niveles de contaminación fúngica de ambos años 2006 y 2007 reveló una mayor presencia en general de especies de *Aspergillus* durante el año 2007.

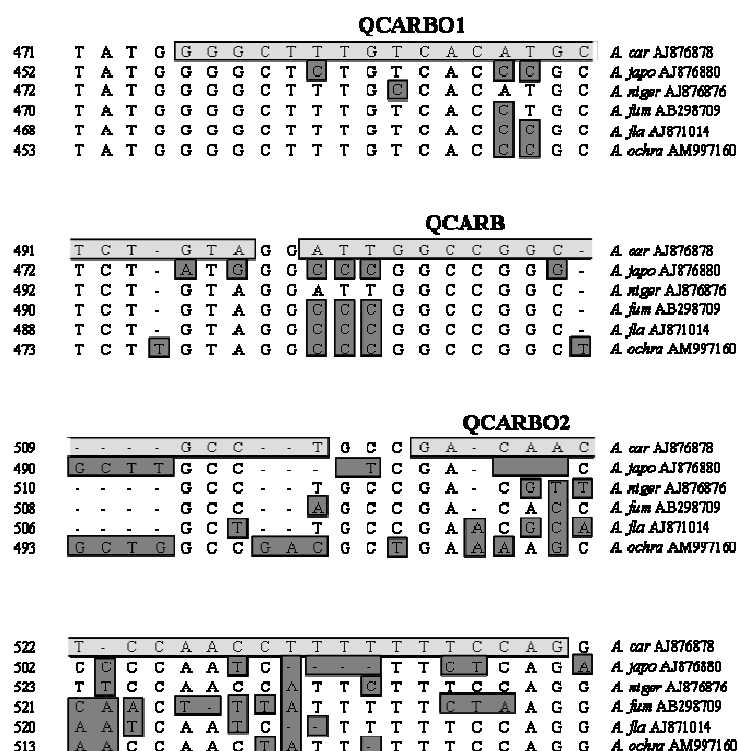
No se detectó en ningún caso presencia de *A. ochraceus* ni *A. japonicus*. Tampoco se observó asociación de *Aspergillus* con ninguna variedad de cereal determinada o una localización geográfica concreta, aunque especialmente en cereal seco, las muestras analizadas son pocas para llegar a una conclusión.

### 3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *A. carbonarius* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Además de las herramientas de identificación descritas anteriormente, se han desarrollado dos protocolos específicos para la detección y cuantificación de *A. carbonarius* mediante PCR a tiempo real usando SYBR Green I y TaqMan. Los cebadores y sonda específicos se diseñaron en base a la comparación de la secuencia de DNA de la región ITS1-5,8S-ITS2 en varios aislamientos de especies de *Aspergillus* obtenidos en nuestro laboratorio (Tabla 2.1 de "Material y Métodos") y otros disponibles en las bases de datos (GenBank), concretamente las de los números de acceso AJ280011 y AJ280012 (*A. carbonarius*), AJ280006 y AJ853742 (*A. niger*),

AJ280008 y AJ280007 (*A. tubingensis*), AJ280014 (*A. ellipticus*), AJ871014 (*A. flavus*) y AB298709 (*A. fumigatus*). Para la obtención de la secuencia de ITS se emplearon los cebadores ITS1 e ITS4 descritos en el Apartado 3.3 de "Material y Métodos". El DNA amplificado se purificó y secuenció como también se describe en los Apartados 3.6 y 3.7 de "Material y Métodos".

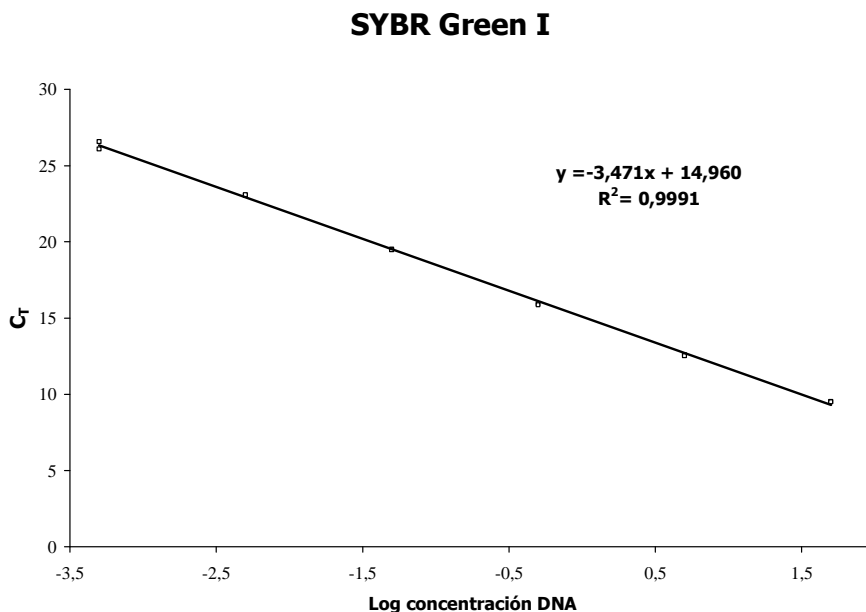
En la Figura 3.13 se muestra el alineamiento de una porción de la región ITS2 en cepas representativas de las especies *A. carbonarius* (AJ876878), *A. japonicus* (AJ876880), *A. niger* (AJ876876) y *A. ochraceus* (AM997160) obtenidas en nuestro laboratorio e introducidas en la base de datos EMBL, y *A. flavus* (AJ871014) y *A. fumigatus* (AB298709), como ejemplos de las obtenidas del GenBank. Los cebadores específicos QCARBO1-QCARBO2 y la sonda TaqMan-MGB QCARB, específicos de *A. carbonarius*, fueron diseñados en base a regiones no conservadas del alineamiento mencionado y localizados en las posiciones indicadas en la Figura 3.13. El conjunto de cebadores y sonda amplifican un producto de 66 pb usando DNA genómico de *A. carbonarius*.

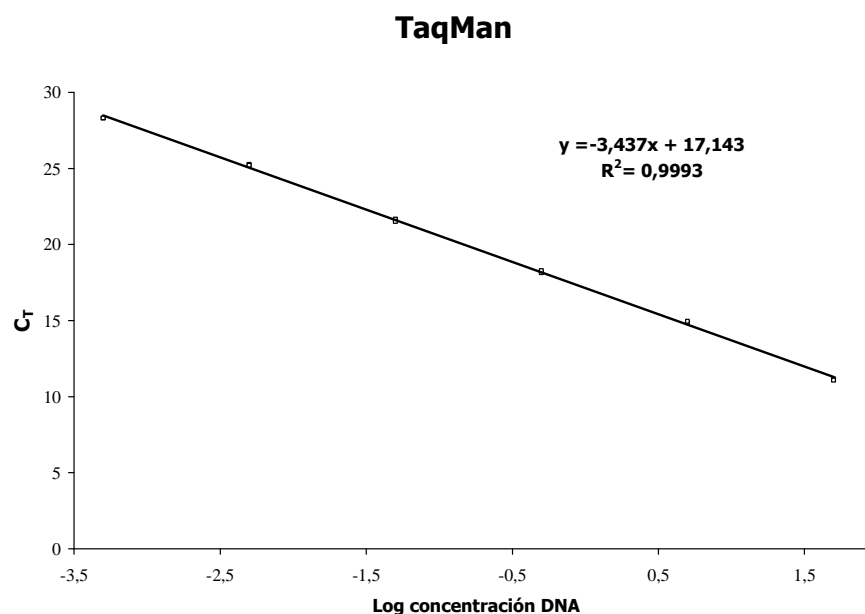


**Figura 3.13.** Alineamiento de un fragmento de la región ITS2 del rDNA en *A. carbonarius* AJ876878, *A. japonicus* AJ876880, *A. niger* AJ876876, *A. flavus* AJ871014, *A. fumigatus* AB298709 y *A. ochraceus* AM997160, y localización de los cebadores QCARBO1, QCARBO2 y la sonda TaqMan QCARB (resaltados en gris claro). Los nucleótidos que difieren de los de la secuencia de *A. carbonarius* se resaltan en gris oscuro.

Antes de iniciar los ensayos de PCR cuantitativa, se probó la especificidad de los cebadores en PCR convencional con diferentes especies de *Aspergillus*, y géneros próximos. En todas las cepas de *A. carbonarius* ensayadas se obtuvo una banda de 66 pb, que no se detectó cuando había DNA de otras especies o géneros. Posteriormente se realizaron las curvas estándar para SYBR Green y TaqMan, como se describe en el Apartado 6.4 de "Material y Métodos".

Las curvas estándar (Figura 3.14) obtenidas empleando DNA de la cepa 171 de *A. carbonarius*, mostraron una gran linealidad entre el logaritmo de la concentración de DNA inicial y el valor  $C_T$  ( $R^2 = 0,9991$  y  $0,9993$  para DNA amplificado con SYBR Green I y TaqMan respectivamente). Dicha linealidad se observó entre valores de 25 a  $2,5 \times 10^{-5}$  ng de DNA por reacción. Estos valores equivalen a  $0,6 - 6 \times 10^6$  equivalentes genómicos por reacción, asumiendo que el tamaño del genoma de *A. carbonarius* es igual al de *A. niger* ( $4,13 \times 10^{-5}$  ng por genoma haploide, descrito en <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/history.html>). Por tanto, la sensibilidad de ambos sistemas fue de 0,6 equivalentes genómicos, que se corresponde con la mínima cantidad detectada mediante nuestros ensayos.





**Figura 3.14.** Curvas estándar obtenidas usando SYBR Green I y TaqMan, mostrando la correlación entre el logaritmo de la concentración de DNA problema (ng/μl) y el ciclo  $C_T$  para diluciones decimales de DNA genómico de la cepa 171 de *A. carbonarius*.

La pendiente de las curvas fue de -3,47 y -3,43 para SYBR Green I y TaqMan respectivamente, indicando que ambos ensayos fueron altamente eficientes. La eficiencia de amplificación,  $E$ , se calcula empleando la pendiente de la curva mediante la fórmula:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Esta fórmula proporciona resultados de eficiencia entre 1 y 2. Para convertir  $E$  en un porcentaje se emplea la fórmula:

$$\% \text{ Eficiencia} = (E-1) \times 100$$

En las curvas obtenidas, el número de copias del amplicón se incrementaba por un factor de 1,94 en cada ciclo, o un 94%, en el caso del ensayo con SYBR Green I. En el caso del ensayo de TaqMan el resultado fue similar, obteniéndose una eficiencia del 95%. Ambas eficiencias fueron, por tanto, muy próximas al 100%. Las demás cepas de *A. carbonarius* ensayadas dieron similares resultados.

## RESULTADOS

La especificidad de los cebadores diseñados fue evaluada mediante el ensayo de SYBR Green I en diferentes aislamientos de *Aspergillus* y otras especies de hongos que frecuentemente se encuentran como contaminantes en uvas (Tabla 3.6). Los resultados indican la especificidad de los cebadores diseñados para la amplificación de *A. carbonarius*.

AISLAMIENTO	ORIGEN	ESPECIE	HOSPEDADOR	QCARBO1/2
CECT 2086		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
242*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
207*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
171*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
173*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
178*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
190*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
168*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
350*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
325*		<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
MUM 04.01**	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
MUM 04.02**	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
MUM 04.03**	Portugal	<i>A. carbonarius</i>	Uva	+
B.ME.A28	Valladolid	<i>A. niger</i>	Uva	-
B.ME.A30	Zamora	<i>A. niger</i>	Uva	-
CECT 2091	Canadá	<i>A. niger</i>		-
TR.20 1	Valladolid	<i>A. tubingensis</i>	Trigo	-
TB.2 1	Soria	<i>A. tubingensis</i>	Trigo	-
ITEM 5135	Italia	<i>A. flavus</i>	Harina	-
ITEM 4592	Francia	<i>A. flavus</i>	Trigo	-
NRRL 465		<i>A. parasiticus</i>		-
T.TT.A13	Zamora	<i>A. fumigatus</i>	Uva	-
T.MV.A21	Valladolid	<i>A. fumigatus</i>	Uva	-
ITEM 4158***	Italia	<i>A. japonicus</i>	Uva	-
ITEM 4685***	Portugal	<i>A. japonicus</i>	Uva	-
CECT 2092		<i>A. ochraceus</i>		-
NRLL 3471		<i>A. ochraceus</i>		-
U-2003	Logroño	<i>A. westerdijkiae</i>	Uva	-
UCO.1	Valladolid	<i>Alternaria consortiale</i>	Uva	-
CECT 2906		<i>Penicillium verrucosum</i>		-
BO.1	Valladolid	<i>Botrytis</i> sp.	Uva	-

**Tabla 3.6.** Aislamientos analizados indicando el origen, la especie, el hospedador y el resultado en los ensayos específicos de PCR con SYBR Green I mediante los cebadores QCARBO 1/2. (\*) Cepas proporcionadas por el Dr. V. Sanchis (Universidad de Lleida, España). (\*\*) Cepas proporcionadas por el Dr. A. Venancio (Universidad de Minho, Portugal). (\*\*\*) Cepas proporcionadas por el Dr. A. Moretti (CNR, Bari, Italia).

La especificidad y sensibilidad de los cebadores fueron comprobadas además en mezclas de DNA de *A. carbonarius* 171 y 325 con otras especies de *Aspergillus*, así como con DNA de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*. Para ello, los DNAs empleados fueron diluidos hasta una concentración de 0,5 ng/μl, y luego mezclados en

las proporciones que se indican en la Tabla 3.7. Los datos de concentración de DNA que aparecen en dicha tabla son los obtenidos por extrapolación de los valores  $C_T$  en la recta patrón. Como se puede observar, los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado para *A. carbonarius*. Se produce una amplificación en el caso de presencia de DNA *A. carbonarius*, mientras que no se observa amplificación en caso de no estar presente. La señal de amplificación tampoco aumenta (lo que significaría amplificación inespecífica) o disminuye (lo que equivaldría a inhibición) si se trata de mezclas de *A. carbonarius* con otros organismos, por lo que se puede concluir de nuevo que los cebadores propuestos son específicos y la señal no se ve modificada con otro DNA que no sea el de esta especie.

ESPECIES (%)		$C_T$		[DNA] (ng/μl)	
		SYBR Green	TaqMan	SYBR Green	TaqMan
<i>A. carbonarius</i>	100	16,26 ± 0,24	18,55 ± 0,37	0,45	0,41
<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i>	50:50	17,32 ± 0,1	19,66 ± 0,19	0,21	0,19
<i>A. carbonarius</i> <i>A. ochraceus</i>	50:50	17,22 ± 0,26	19,77 ± 0,06	0,23	0,17
<i>A. carbonarius</i> <i>A. flavus</i>	50:50	17,30 ± 0,24	19,63 ± 0,11	0,22	0,18
<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i>	25:75	18,45 ± 0,31	20,63 ± 0,3	0,10	0,09
<i>A. carbonarius</i> <i>A. ochraceus</i>	75:25	16,65 ± 0,33	18,87 ± 0,51	0,35	0,33
<i>A. carbonarius</i> <i>A. flavus</i>	25:75	18,50 ± 0,21	20,91 ± 0,35	0,10	0,08
<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i> <i>A. ochraceus</i>	33:33:33	18,02 ± 0,23	20,13 ± 0,46	0,13	0,14
<i>A. carbonarius</i> <i>F. culmorum</i>	50:50	17,31 ± 0,09	19,48 ± 0,34	0,21	0,20
<i>A. carbonarius</i> <i>P. verrucosum</i>	50:50	17,35 ± 0,17	19,70 ± 0,3	0,21	0,18
<i>A. carbonarius</i> <i>A. consortiale</i>	50:50	17,62 ± 0,12	19,49 ± 0,48	0,22	0,21
<i>F. culmorum</i> <i>A. consortiale</i>	50:50	29,47 ± 0,03	30,80 ± 0,25	ND	ND
<i>A. niger</i>	100	31,48 ± 0,01	32,48 ± 0,19	ND	ND
<i>A. niger</i> <i>A. ochraceus</i>	50:50	29,99 ± 0,27	30,44 ± 0,48	ND	ND
NTC		32,82 ± 0,35	33,93 ± 0,36	ND	ND

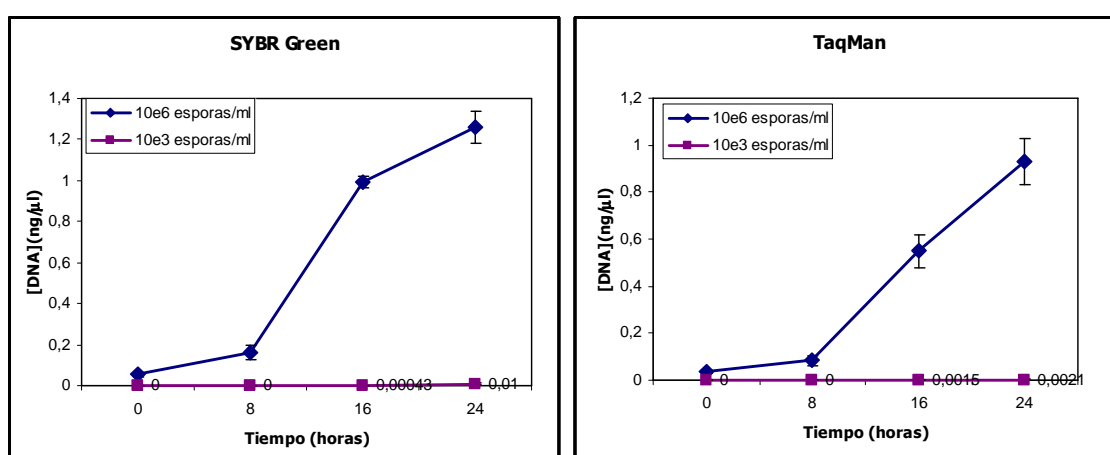
**Tabla 3.7.** Resultados de valores  $C_T$  y concentración de DNA de *A. carbonarius* 173 y 325 puros y mezclados con DNA de otros *Aspergillus*, *F. culmorum*, *P. verrucosum* y *A. consortiale*. Los resultados son la media de los experimentos con las dos cepas. Se muestra la desviación estándar de cada experimento. NTC= Control negativo. ND= No detectado (Concentración de DNA <  $2 \times 10^{-4}$  ng/μl).



Con el objetivo de comprobar la eficacia del método de cuantificación propuesto sobre una matriz alimentaria, se desarrolló además un ensayo de detección sobre muestras de uvas contaminadas artificialmente. En este procedimiento se inocularon uvas separadamente con dos niveles de suspensiones de esporas ( $10^3$  y  $10^6$  esporas/ml) de las cepas de *A. carbonarius* 171, 173 y 325, y posteriormente fueron incubadas. Las reacciones de qPCR se realizaron tras 0, 8, 16 y 24 horas de incubación. Los resultados de valores de  $C_T$  se muestran en la Tabla 3.8. Los resultados de concentración de DNA, obtenidos por extrapolación de los valores  $C_T$  en la recta patrón, se representan en la Figura 3.15.

TIEMPO INCUBACIÓN (h)	10 <sup>3</sup> ESPORAS		10 <sup>6</sup> ESPORAS	
	SYBR Green	TaqMan	SYBR Green	TaqMan
0	32,07 ± 1,08	32,75 ± 0,46	19,56 ± 0,65	22,21 ± 0,31
8	32,96 ± 1,98	31,61 ± 1,02	17,83 ± 0,79	21 ± 0,61
16	26,56 ± 0,6	26,80 ± 0,96	15,34 ± 1,19	18,11 ± 0,41
24	22,78 ± 1,45	24,79 ± 0,79	14,6 ± 0,2	17,25 ± 0,33
NTC	36,49 ± 0,67	35,71 ± 0,22	36,49 ± 0,67	35,71 ± 0,22

**Tabla 3.8.** Valores  $C_T$  en los ensayos de detección de *A. carbonarius* 171, 173 y 325 en uvas contaminadas artificialmente usando SYBR Green I y TaqMan tras diferentes tiempos de incubación. Los valores mostrados son las medias y las desviaciones estándar de los experimentos con las tres cepas.



**Figura 3.15.** Detección mediante PCR a tiempo real de *A. carbonarius* 171, 173 y 325 usando SYBR Green I y TaqMan en uvas contaminadas artificialmente. Se representa la concentración de DNA (ng/μl) frente al tiempo de incubación (h) para muestras de uvas contaminadas inicialmente con  $10^3$  (rosa) y  $10^6$  (azul) esporas/ml. Se representan las medias y las desviaciones estándar (barras de error) de los experimentos con las tres cepas.

Se observó amplificación para uvas inoculadas con la suspensión de  $10^6$  esporas/ml en todos los tiempos de incubación, e incluso sin incubación, tanto en los ensayos de SYBR Green I como en los de TaqMan (Tabla 3.8 y Figura 3.15). En el caso de la inoculación de  $10^3$  esporas, fue necesaria una incubación de 16 horas para obtener una señal de amplificación en ambos casos.

El límite de detección de DNA de *A. carbonarius*, representado por valores  $C_T$  mayores a los obtenidos con DNA de uva o el propio control negativo, fue de 0,6 pg mediante ambos métodos, equivalente a 0,4 pg de hongo/g de uva. Como se muestra en la Figura 3.15, tras la inoculación, la cantidad de DNA de *A. carbonarius* aumentó de forma similar en ambos ensayos. El mayor aumento se dio tras 8 horas de incubación, alcanzando finalmente concentraciones de DNA de 1,26 y 0,93 ng/ $\mu$ l en los ensayos de SYBR Green I y TaqMan respectivamente.

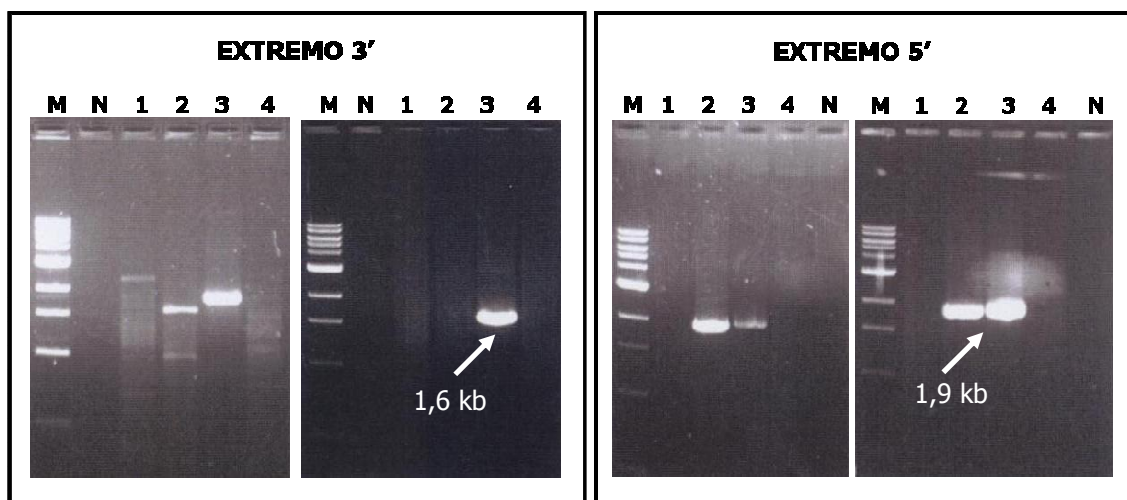
Previo a este ensayo, se realizaron estudios de inhibición con mezclas de DNA de *A. carbonarius* y DNA de uvas. Las amplificaciones de DNA de *A. carbonarius* y DNA de *A. carbonarius* más DNA de uva mostraron valores  $C_T$  cuyas diferencias fueron estadísticamente no significativas ( $P > 0,05$ ), usando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Estados Unidos).

#### **4. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. ochraceus* Y *A. carbonarius***

##### **4.1. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *p450-B03* EN *A. ochraceus* MEDIANTE PASEO CROMOSÓMICO**

Partiendo de una secuencia parcial de DNA de 463 pb del gen del citocromo p450-B03 (DQ054596), descrita por O'Callaghan *et al.* en 2006 y cuya expresión se correlacionaba positivamente con la producción de OTA en la cepa HP99 de *A. ochraceus*, se procedió a su amplificación hasta sus extremos 5' y 3' mediante la técnica del paseo cromosómico ("genome walking"), técnica descrita en el Apartado 7.1 de "Material y Métodos". Para ello, se utilizaron los cebadores descritos en la Tabla 2.4. La técnica se llevó a cabo en el laboratorio del Prof. Alan Dobson, en el University College Cork (Irlanda), a partir de mezclas de restricción obtenidas, de la manera que se indica en el Apartado 7.1 de "Material y Métodos", en ese mismo laboratorio.

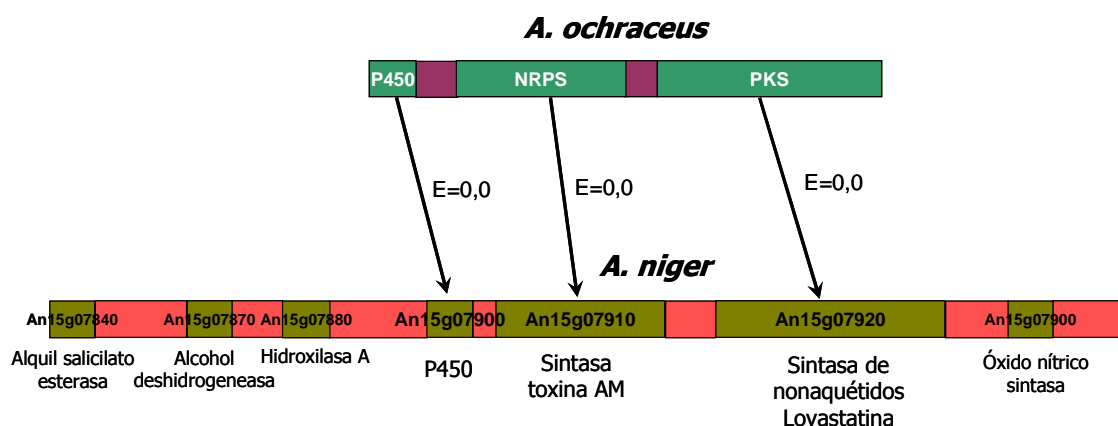
En la primera ronda se obtuvo un fragmento de 1,6 kb por el extremo 3' y dos de 1,9 kb por el 5' (Figura 3.16), que se clonaron para obtener su secuencia nucleotídica como se indica en el Apartado 3.4 de "Material y Métodos". De esta manera, se obtuvo una secuencia de un total de 3748 pb, que contenía la región codificadora completa de una monooxigenasa del citocromo P450, a la cual llamaremos *aocrp450*.



**Figura 3.16.** Amplificaciones primarias (izquierda en cada caso) y anidadas (derecha en cada caso) hacia los extremos 3' y 5' usando las distintas mezclas de restricción (Carriles 1-4). Carril N: Control negativo. Carril M: Marcador GeneRuler 1 kb. Se clonaron todas las bandas obtenidas en las reacciones de PCR anidadas.

En la segunda ronda de paseo cromosómico se lograron obtener dos fragmentos de 3,4 kb por el extremo 3' y 2,8 kb por el extremo 5', respectivamente. En el extremo 5', por comparación de secuencias con las bases de datos, no se identificó ninguna secuencia con similitud a algún gen, mientras que el fragmento obtenido por el extremo 3' se pudo determinar similitud con un gen codificador de una proteína sintetasa de péptidos no ribosomales ("Non-ribosomal Peptide Synthetase", NRPS), y a continuación el gen *pks* descrito como implicado en la síntesis de OTA en *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003). Este resultado apoya que posiblemente los genes de la biosíntesis de OTA estarían también agrupados en *cluster*, al igual que los de la biosíntesis de otras micotoxinas.

Los tres genes así obtenidos, *aocrp450*, que codifica para una P450, *nrps*, que codifica para una sintetasa de péptidos no ribosomales, y *pks*, que codifica para una poliquétido sintasa, se compararon con otras secuencias presentes en el GenBank, revelando elevadas homologías ( $E=0,0$  en todos los casos) con la secuencia de tres genes adyacentes, situados en el mismo orden en el cromosoma 3 de la secuencia genómica de *A. niger* (Pel *et al.*, 2007), y denominados *An15g07900* (similar a *aocrp450*), *An15g07910* (similar a *nrps*) y *An15g07920* (similar a *pks*) (Figura 3.17). La función de dichas proteínas es desconocida, sin embargo a la proteína An15g07900 se la describe como "altamente similar al citocromo P450 de *Myrothecium roridum*", a la proteína An15g07910 se la describe como "altamente similar a la sintetasa del péptido cíclico de la toxina AM de *Alternaria alternata*", y a la proteína An15g07920 como "altamente similar a la sintetasa de nonaquéridos de lovastatina lovB de *Aspergillus terreus*". Los genes situados a continuación incluyen proteínas similares a alcohol deshidrogenasas y esterasas, frecuentemente implicadas en los *cluster* de producción de otras micotoxinas (Seo *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2004a), por lo que pudiera tratarse, con gran probabilidad, del *cluster* de producción de OTA de la especie *A. niger* (Figura 3.17).



**Figura 3.17.** Representación esquemática, a escala, del tamaño y la situación de los genes obtenidos en *A. ochraceus* mediante paseo cromosómico (arriba), y la situación y tamaño de genes con elevada homología en el genoma de *A. niger* (abajo), señalados con flechas e indicando su posible función. Se señalan otros genes próximos con funciones relevantes.

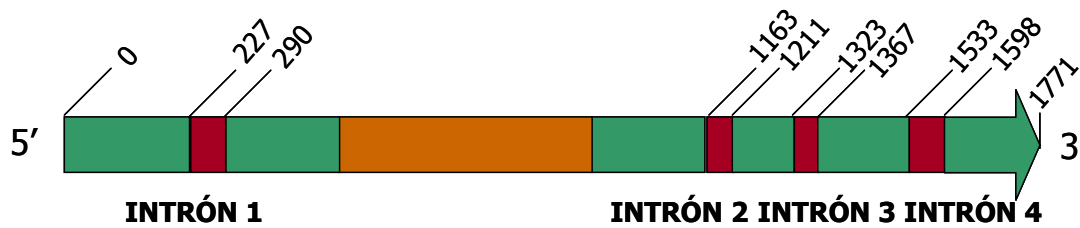
El gen *aocrp450* presentaba una longitud de 1771 pb, con un marco de lectura abierto de 1545 pb. La comparación de su secuencia con otras presentes en el GenBank reveló similitud con numerosos miembros de la superfamilia de citocromos P450 de hongos filamentosos, con una identidad entre el 64% ( $E=0,0$ ) y el 24% ( $E=1e-33$ ). La mayor homología ( $E=0,0$ ) correspondió a la monooxigenasa P450 de *A. niger* An15g07900 cuya función, como se ha comentado, es desconocida, aunque pudiera estar implicada en la síntesis de OTA (Nº de acceso XP\_001397311). Otros valores interesantes correspondieron a homologías del 32% ( $E=1e-54$ ) y 29% ( $E=1e-36$ ) para los genes *tri4* de síntesis de tricotecenos en *Fusarium sporotrichioides* y *cypA* de síntesis de aflatoxinas en *A. flavus*, respectivamente.

La comparación de la secuencia genómica del gen *aocrp450* con la del cDNA permitió determinar la localización y tamaño de los intrones. La secuencia obtenida, así como la secuencia de aminoácidos deducida utilizando el programa EditSeq (Larsegene, Estados Unidos), se representan en la Figura 3.18. En la siguiente Figura (Figura 3.19) se muestra una representación esquemática de la estructura del gen y las posiciones que ocupan en él cada uno de los intrones.

La secuencia génica del gen *aocrp450* se encuentra interrumpida por cuatro intrones, cuyos tamaños son 64, 49, 46 y 67 nucleótidos, respectivamente. Las características de tamaño de intrones y secuencias conservadas implicadas en su procesamiento son similares a las descritas en hongos filamentosos (Unkles, 1992; Gurr *et al.*, 1987). Los intrones 2 y 3 se encuentran situados entre dos codones, es decir, están en fase del marco de lectura 0. Sin embargo, el intrón 1 se encuentra situado entre el primer y el segundo nucleótido de un codón (fase 1), y el intrón 4 se encuentra situado entre el segundo y el tercer nucleótido de un codón (fase 2) (Patthy, 1987). Todos los intrones tienen en sus extremos 5' y 3' el par de nucleótidos GT y AG respectivamente (ver Figura 3.18) (Gurr *et al.*, 1987). También las secuencias de escisión del extremo 5' cumplen con lo descrito para hongos filamentosos, GTPuNGPy (Unkles, 1992), excepto en el intrón 1, que presenta una purina en lugar de la pirimidina de la sexta posición de la secuencia consenso. En el extremo 3' la secuencia de escisión encontrada en los tres primeros intrones se ajusta a la consenso descrita, PyAG (Gurr *et al.*, 1987), mientras que el último intrón presenta una purina en lugar de la pirimidina en la primera base.

	ATGGACTTTGACCTATTTGCCCCAAAGCACACCTTCTTTGGCTTTTGGTGGCCACGCCT	60
1	M D F D L F A P K A H L L W L L V A T P	
	TTATTTTACGTGCTTAATACGGTGGTCTACGAGCTTTTCTTTTCTCCGCTATCGCATATC	120
21	L F Y V L N T V V Y E L F F S P L S H I	
	CCTGGGCCGAAGTTGGCTGCATGCACACGCCTGTACGAATTGTATTACGACATAATTCTA	180
41	P G P K L A A C T R L Y E L Y Y D I I L	
	CATGGTAGATATACATTTAAGATCGCTGAGCTGCATAAGAAATACG <b>gtatggaatcttga</b>	240
61	H G R Y T F K I A E L H K K Y	
	<b>ccgctcgggacttcgtctattcttataccaacgtgtgataaatgccgcag</b> GACCTATCAT	300
76		
	TCGTATTAGCCCGGGGAAGTACACATCAACGACCCTGAATATTACGAGACGCTATATTC	360
80	R I S P G E V H I N D P E Y Y E T L A Y S	
	AATCAATGGGCCACGCAACAAAGATTCATGGTTCGTCGAGTCGTTTGACGTCGCTGAGTC	420
100	I N G P R N K D S W F V E S F D V A E S	
	GGCCTTCGCGACGCTCGATCACGCCTCCATAGACCCCGTCGTGCTCTGATCGCTCCCTA	480
120	A F A T L D H R L H R P R R A L I A P Y	
	CTTTGCCAAAGCGCG <b>GTACAGCGTATTCACTCACTCATTAGAGTAAACTTCAGAACT</b>	540
140	F A K A R V Q R I Q S L I Q S K L Q K L	
	<b>GAATACCCGGTTGAGCGAGTATGCTCACTCGGGGAGCCCCCTAAAAGTAGACGTCGCATT</b>	600
160	N T R L S E Y A H S G E P L K V D V A F	
	<b>CAACTGTTTCACCGCCGACATTATCACCTCTTATACGAGCTTCCGTGCGTTCAACTACCT</b>	660
180	N C F T A D I I T S Y T S F R A F N Y L	
	<b>AGACGACCCCGAGATGGTCCCTATATGGAGTGAAACAATTAAGAACCTCGTCGAGATCGG</b>	720
200	D D P E M V P I W S E T I K N L V E I G	
	<b>AATGATCGCCCGCATCTTCCGGGATTTTCCCTCTTCTGGCGAGCATGGAATGAAGT</b>	780
220	M I A R H L P G F F P L L A S M G M K W	
	<b>GGTCAAGCGGGTTTATCCAAGTTGCTCCCTGTGATTGCATTTTGAATGAAATGTGCCCA</b>	840
240	V K R V Y P K L L P V I A F R M K C A Q	
	<b>GGAGGTGAACCTTATGTGGGAGAACGAAGAAGAGGCGAAGCTAGACTTTGAGAAAAACAG</b>	900
260	E V N F M W E N E E E A K L D F E K N R	
	<b>ACTCTCCAGGAACCGCGCTTTTCCAGGAATGGTCGCCAAAGCCCCGATACCCCTGA</b>	960
280	L S Q E P A L F Q E M V A K A P D T P D	
	TGTCACCGAGGCTAGGGTTCTTCATGAATACATTACCATTGTGGCCGCGGGAACCTGAAAC	1020
300	V T E A R V L H E Y I T I V A A G T E T	
	GACAGCCCATACAATGACAGTCTGTACGTTCTATGTGTTAAACGATCAAGCAGTCTTGCG	1080
320	T A H T M T V C T F Y V L N D Q A V L R	
	CAAGCTACGAGCGGAGTTGGACGAGACCTTCCCCAAGAAGAAGGAGATGGACTTACAAAC	1140
340	K L R A E L D E T F P P K K K E M D L Q T	
	GCTTGAACAACCTCCATACTTG <b>gtacgtgccttagaaatggagtgccggaagatggaact</b>	1200
360	L E Q L P Y L	
	<b>gacctaaacag</b> ACTGGAATTATATATGAAGGACTGCGACTATCTTACGGACTTTTCGCACC	1260
368	T G I I Y E G L R L S Y G L S H	
	GTCTCCAGAGAATCTGTCCGACTGACCCGCTTCAGTTCAAAGACGTGGTCATCCCGCCCA	1320
383	R L Q R I C P T D P L Q F K D V V I P P	
	AT <b>gtaggtgaagctacaggagagttcgaaatcgacgtaacagacctag</b> ACGTCGATCGGA	1380
403	N	
	ATGTCTTCGGCGCTTATTCACCACGACGAGTCTATCTTCCCCAACTCTCATGAGTTTCGTC	1440
408	M S S A L I H H D E S I F P N S H E F V	
	CCAGAACGATGGACGGATCTCGAGGAGAGGAAAAGATTGAACAAATACTTGGTCTCTCTTC	1500
428	P E R W T D L E E R K R L N K Y L V S F	
	AGCAAGGGAGCCGCAATGCATTGGAATGAAG <b>gtaggttcacgattcggttctctctctcg</b>	1560
448	S K G A R Q C I G M N	
	<b>ctcttctcttttttgcgagtgctaaactgacccgggaaaag</b> TTTGGCATTTGCGGAACCTTA	1620
459	L A F A E L Y	
	CATGGCTGTGCTACAATCTTCCGCACGTTTGACATGAAGTTGCATAAGACTACAGTGGA	1680
466	M A V A T I F R T F D M K L H K T T V D	
	TGACGTCCGGCTGCACAGGGACATGATGCTGCCACACCCAGAGCAGGCAGCAAGGGCGT	1740
486	D V R L H R D M M L P H P R A G S K G V	
	AAGAGTAACAATTGTTCTCTTAAGCAGTGA	1771
506	R V T I V P L K Q stop	

**Figura 3.18.** Secuencia de nucleótidos del gen *aocrp450* (en negro) y aminoácidos de su correspondiente polipéptido (en verde). Los intrones se diferencian en letra roja y minúscula, y las secuencias implicadas en su procesamiento se resaltan en negrita. Los nucleótidos y aminoácidos aparecen numerados a la derecha y a la izquierda, respectivamente. La secuencia nucleotídica de la que se partió para realizar el paseo cromosómico aparece en naranja.

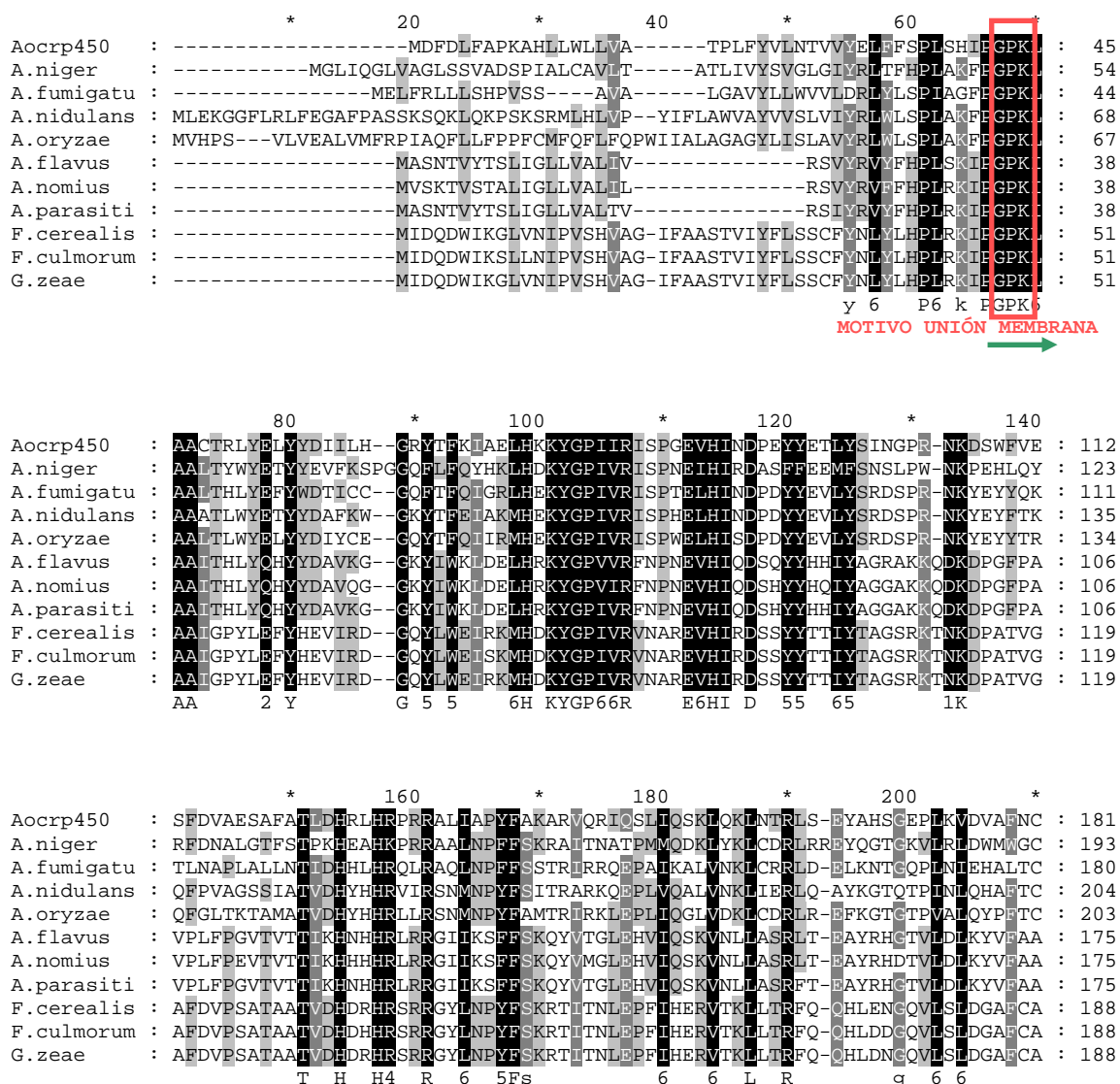


**Figura 3.19.** Esquema de la estructura del gen *aocrp450* en *A. ochraceus*. Los intrones aparecen representados en rojo, y los exones en verde. La secuencia nucleotídica de la que se partió para realizar el paseo cromosómico aparece representada en naranja. Los números corresponden a la situación de los intrones y exones en pb.

La secuencia de aminoácidos, deducida con el programa EditSeq, corresponde a una proteína de 514 aminoácidos, con una masa molecular de 59,3 kDa y un punto isoelectrico de 7,77. En cuanto a su estructura, la secuencia de aminoácidos deducida muestra la presencia de regiones conservadas características de enzimas P450 (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000), la mayoría incluidas en 4  $\alpha$ -hélices (I, J, K y L) (Figura 3.20). La región principal, deducida mediante el programa PROSITE del servidor ExPASy, es el bucle de unión al átomo de hierro del grupo hemo, que contiene la secuencia consenso más característica de ésta superfamilia (F-X-X-G-X-R-X-C-X-G), localizada en la hélice L (aminoácidos 446-455) y donde se localiza el residuo invariable de cisteína que sirve como quinto ligando al átomo de hierro del grupo hemo.

La segunda región es el motivo totalmente conservado E-X-X-R, en la hélice K (aminoácidos 372-375), probablemente necesario para estabilizar la estructura del núcleo central. La tercera región es la parte central de la hélice I (aminoácidos 315-320), que contiene la secuencia consenso A/G-G-X-D/E-T-T/S, la cual corresponde al surco de transferencia de protones. Además, la secuencia deducida también posee el motivo de unión a membrana P-X-P en el extremo N-terminal (Ehrlich *et al.*, 2004).

Hemos comparado la secuencia de aminoácidos del gen *aocrp450* con las de otras proteínas monooxigenasas del citocromo P450 fúngicas ya descritas, alineando sus secuencias mediante el método CLUSTAL utilizando el programa MegAlign (Larsegene, Estados Unidos). Las secuencias incluidas en el alineamiento pertenecen a la superfamilia de citocromos P450, concretamente de proteínas de función desconocida de *A. niger* (XP\_001397311), *A. fumigatus* (XP\_748206), *A. nidulans* (XP\_659398) y *A. oryzae* (XP\_001817189), genes del citocromo CYPa implicado en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* (AAS89997), *A. nomius* (AAS90045) y *A. parasiticus* (AAS66021), y genes del citocromo TRI4 implicado en la síntesis de tricotecenos en *F. cerealis* (AAM48764), *F. culmorum* (AAM49028) y *Gibberella zeae* (AAM48748). El resultado se muestra en la Figura 3.20.





## RESULTADOS

```

                220          *          240          *          260          *          280
Aocrp450 : FTADILTSYTSFRAFNLYLDD*EMVPIWSETIKNLVEIGMIARHLPGFFPL*ASMGMKVVKRYPKLLPVI : 251
A.niger : IASDILVHYCFNDGYGFINAPDFRSVFIQAMFDLLDMVHVLVQFFWVGVLNRLPQKFVEAVNPGLKSIN : 263
A.fumigatu : YTTDVLTIDYSMDGYHYLDAPDFIPQWHGTNLNGTAKTMVFIKPVAVALPLLALPEAVTAWLNPGMELFF : 250
A.nidulans : FATDVVSDYSMCGVFHYLDEPDFIPDWSDTLAWSVKNGVYLKAFWWSGALNSLPPWLLSRITPGMGLVF : 274
A.oryzae : FATDVVTDYTMGAGFHYLDEPDFVPRWSRTLSGVAKSGVYIKPFPWLKVFNALPESWLSWLNPEMDLTF : 273
A.flavus : LTSDLTTHVYVYCTNLNHLAEPDFK---NDFLAGMDSVGPWIPVLLVFGRLKLARYLPACIVP--AGEFL : 240
A.nomius : LTSDLTTHVYVYCTNLNHLAEPDFK---NDFLAGMDSVGRWIPVLLVFGRLKLARYLPACIVP--AGEFL : 240
A.parasiti : LTSDLTTHVYVYCTNLNHLAEPDFK---NDFLAGMDSVGPWIPVLLVFGRLKLARYLPACIVP--AGEFL : 240
F.cerealis : LTADVITNRFYCKHNDYLSLPDFHFVVRDGFGLTKVYHLARFLPAVVTVKRLPYSCIRMIAPSVCDDL : 258
F.culmorum : LTADVITNRFYCKHNDYLSLPDFHFVVRDGFGLTKVYHLARFLPALVTVKRLPYSCIRMIAPSVCDDL : 258
G.zeae : LTADVITNRFYCKHNDYLSLPDFHFVVRDGFGLTKVYHLARFLPAVVTVKRLPYSCIRMIAPSVCDDL : 258

```

D6 g 6 Pdf 61 6

```

                *          300          *          320          *          340          *
Aocrp450 : AFRMKCAQEVNFMWENEEAKLDFEKNRSLQEPALFQEMVAKAPDTPDVTPEARVLEHYITIVAAGIETTA : 321
A.niger : HYNREMASQITDILRSKEYGTMKESQRK-----TVFNALLEGLPEELTLRRIRREAFITVIGAGIETTA : 328
A.fumigatu : DFQRRCKMKIKRIVAAHNEKGNQGVQNE--GFVNFIDDLRSNLPKANKSETRLAQEMQVIVSAGIETTA : 318
A.nidulans : QFQDRNRIRVQIMEEQKERGYEEVKNQF-DHPTFFHDVLTSLNPKELKTPDRIAREVQAVIAGIETTA : 343
A.oryzae : HFQRRCREVIASIMEEQNANGYDKVKSQF-SHPTFFHDVLSNLPPEEKSPERLWQEVQVVGAGIETTA : 342
A.flavus : HLWTLSERRVGEILDSQDNGTMGDQK-----TLQAMATANVPEEKTATRLQMETLNIIGAGIETTA : 303
A.nomius : HLWTLSERRVGEILGSKNNGTMGDRK-----TLQAMATADVPEEKTATRLQMETLNIIGAGIETTA : 303
A.parasiti : HLWTLSERRVGEILDSQDNGTMGDQK-----TLQAMATADVSEETATRLQMETLNIIGAGIETTA : 303
F.cerealis : QMRDEIQDRGGEFLA-NKSHEAKSS-----ILFGALADSHIPAHERTVERMLDEGTVILFAGIETTA : 320
F.culmorum : QMRDEIQDRGGEFLS-NKSHEAKSS-----ILFGALADSHIPAHERTVERMLDEGTVILFAGIETTA : 320
G.zeae : QMRDEIQDRGGEFLS-NKSHEAKSS-----ILFGALADSHIPAHERTVERMLDEGTVILFAGIETTA : 320

```

6 p 3 R6 E 66

TRANSFERNIA PROTONES

```

                I          J          K
                360          *          380          *          400          *          420
Aocrp450 : HTMTVCTFYVINDQAVLRKLAELDETFFKKK-EMDLQTLLEQLPYLTGITTYEGLRIS-YGLSHRL----Q : 385
A.niger : YALAVASYHILSTSIYKRLREELITAIPDPTNFPLSELEKLPYLTGCLQSCIRIS-YGVQVRS----P : 393
A.fumigatu : KAITYILFYLLNDPETMAKLAELTVGED---PALVQLLEQLPYLTGVMLIGIRIS-YGVSAKL----P : 379
A.nidulans : KMLTWTMYLLENPDKNALKEELNRLDPDQT--ATLVDFEKMPLYLTSVMIIGLRIS-YGSSSRL----Q : 406
A.oryzae : KALTWTMYLHSPDKLQKLREELNQLDPDRT--ATLLDFEKMPLYLTSVMIIGLRIS-YGLSTRL----Q : 405
A.flavus : RALAVGVFHIAHKPSLLQLRDELRTVMPPFDSSASWTQLEQLPYLVCSRIGGLRKAFCGPLASLFDLH : 373
A.nomius : RALAVGVFHIAHKPSLLQLRDELRTVMPPFDSTASWTQLEQLPFVCSRIGGLRKAFCGPLASSFDLH : 373
A.parasiti : RALAVGVFHIAHKPSLLQLRDELRTVMPPFDSSASWTQLEQLPYLAGVNESLRIS-FGFIIRS----A : 368
F.cerealis : RTLAITVFYLLTHPECLKKLREELNLSPPVKDQ-HSLSTLENLPYLVNGVIEGFRJA-FGPISRS----G : 384
F.culmorum : RTLAITVFYLLTHPECLKKLREELKTLPPAKDANYPLSTLENLPYLVNGVIEGFRJA-FGPISRS----G : 385
G.zeae : RTLAITVFYLLTHPECLKKLREELKTLPPAKDANYPLSTLENLPYLVNGVIEGFRJA-FGPISRS----G : 385

```

6 5 6 p L4 EL p 1E 6P5L e r 5 5G r

MOTIVO EXXR

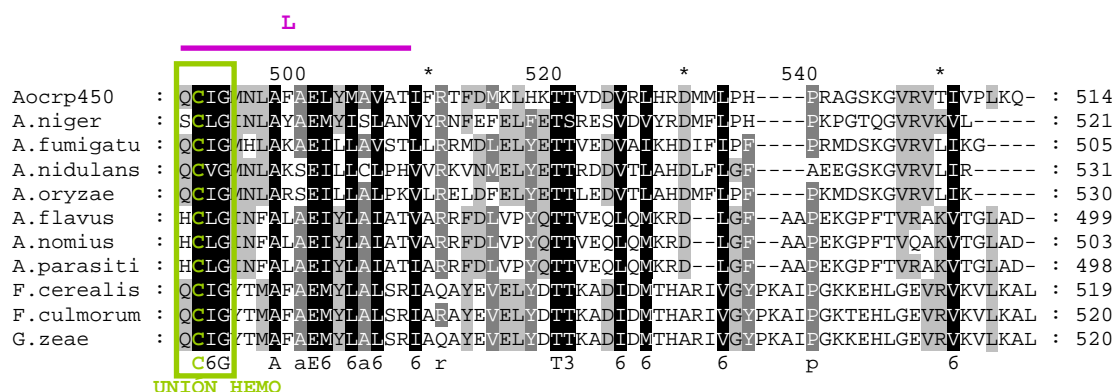
```

                *          440          *          460          *          480          *
Aocrp450 : RICPTDPLQFQDVVTPPNTSIMGSSALIHHEESIFENSHEFVPERWTD---LEERKRLNKYLVSFSGAR : 452
A.niger : RVSDKFPLIYKWTTPAGTIIISMDNYSVSHDEAIFDSFTFKPERWIDDPVAPDGRKLTRYLVSFGRGTR : 463
A.fumigatu : RIAPYNALKFRDWTTPPGVPVSMSCLLMHNETVFPDSHREKPERWID---PAERKRLEKYMVAFSKGSR : 446
A.nidulans : RIAPDRDLKFKEWSTPAGTPVGMTSVLIHNEEIFFDSHREKPERWID---PEKRYLEKYMVSFKGSR : 473
A.oryzae : RVAPDRALQFREWSIPAGTPVGMTSTLMHDERIFFDSHREKPERWID---LEQRKHLEKYMVAFSKGSR : 472
A.flavus : AFTRTLWCTKTLLSEPA----QSAYFVCMPSIFQPEDENPDRAWQAT--RDGNLHRYLIVFSKGSR : 437
A.nomius : AFTPTILWCTKTLLSEPAITPSQSAYFVCMPSIFQPEDENPDRAWQAA--CEGHNHRYMIVFSKGSR : 441
A.parasiti : RVYPNDPLVIEDLVTPPGTIPSQSAYFVCMPSIFQPEDENPDRAWQAA--REGNNHRYLIVFSKGSR : 436
F.cerealis : RVATQENLKYEHVTPAGTIPSQSTYFMHTDPKNFEEPEKPERWIEAQ--QKGIPKKYITNFSQGSR : 452
F.culmorum : RVATQENLKYEHVTPAGTIPSQSTYFMHTDPKNFEEPEKPERWIEAQ--QKGIPKKYITNFSQGSR : 453
G.zeae : RVATQENLKYEHVTPAGTIPSQSTYFMHTDPKNFEEPEKPERWIEAQ--QKGIPKKYITNFSQGSR : 453

```

r l i p t 6 1 FP F P RW L 4Y6 r G R

UNIÓN HEMO



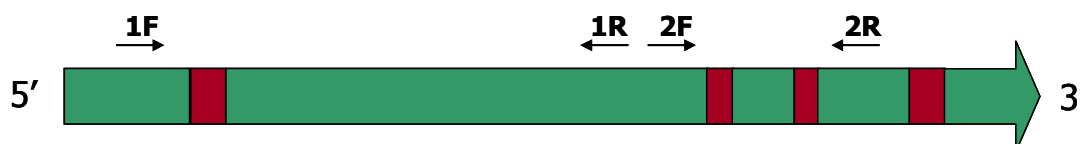
**Figura 3.20.** Alineamiento mediante el método CLUSTAL de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *aocrp450* con citocromos de la superfamilia P450 de *A. niger* (XP\_001397311), *A. fumigatus* (XP\_748206), *A. nidulans* (XP\_659398), *A. oryzae* (XP\_001817189), *A. flavus* (AAS89997), *A. nomius* (AAS90045), *A. parasiticus* (AAS66021), *F. cerealis* (AAM48764), *F. culmorum* (AAM49028) y *Gibberella zeae* (AAM48748). Los residuos iguales se resaltan sobre fondo negro y los similares sobre gris. Los dominios de hélices I, J, K y L se indican en rosa encima de la secuencia. También se indican los aminoácidos altamente conservados de unión a la membrana (recuadro rojo), de transferencia de protones (recuadro azul), motivo EXXR (recuadro naranja) y aminoácidos de unión al átomo de hierro del grupo hemo (recuadros verdes). Las zonas de diseño de cebadores degenerados aparecen representadas con flechas verdes en la parte inferior de las secuencias.

En el alineamiento podemos observar que el grado de similitud entre las secuencias comparadas es bastante alto, con residuos altamente conservados entre ellas. Las regiones de aminoácidos conservados, comunes a todos los citocromos P450, aparecen señaladas (Figura 3.20).

#### 4.2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN HOMÓLOGO DEL CITOCROMO *aocrp450* EN *A. carbonarius* MEDIANTE CEBADORES DEGENERADOS

Una vez secuenciado y analizado el gen completo *aocrp450* en *A. ochraceus*, y sabiendo que se encontraba en el *cluster* de producción de OTA de esa especie, nuestro objetivo fue la obtención de su homólogo en *A. carbonarius*. Para ello, se diseñaron cebadores degenerados en base a regiones conservadas de las secuencias de aminoácidos de otros genes de citocromos P450 descritos anteriormente (Figura 3.21), prestando especial interés a la secuencia aminoacídica de *A. niger* ya que, debido a su proximidad filogenética con *A. carbonarius*, pudiera utilizar codones

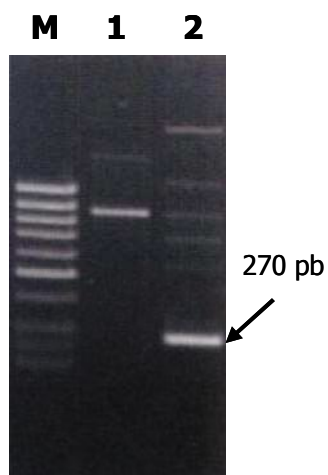
similares. Los cebadores diseñados se muestran en la Tabla 2.5 de "Material y Métodos", y su situación relativa en la secuencia de *A. ochraceus* está representada en las Figuras 3.20 y 3.21.



**Figura 3.21.** Esquema de la estructura del gen *aocrp450* en *A. ochraceus*. Los intrones aparecen representados en rojo, y los exones en verde. Se señala con flechas la situación relativa de los cebadores degenerados utilizados para obtener la secuencia parcial de este gen en *A. carbonarius*. 1F: Cebador p450 CARB 1F; 1R: Cebador p450 CARB 1R; 2F: Cebador p450 CARB 2F; 2R: Cebador p450 CARB 2R.

Las zonas en las que se diseñaron pertenecían al motivo de unión a membrana del extremo N-terminal (cebador p450 CARB 1F), la zona de transferencia de protones de la hélice I (cebador p450 CARB 1R), y el inicio de las hélices K y L (cebadores p450 CARB 2F y p450 CARB 2R) (ver Figura 3.20).

Se emplearon diferentes combinaciones de los cuatro cebadores para la amplificación por PCR de DNA genómico de la cepa 325 de *A. carbonarius*. La amplificación a partir de DNA genómico con los cebadores degenerados resulta en un patrón múltiple de bandas tal y como se muestra en la Figura 3.22. De los fragmentos generados, se purificaron, clonaron y secuenciaron aquellos fragmentos que presentaban una banda de un tamaño esperado para la zona comprendida entre los cebadores utilizados.



**Figura 3.22.** Ejemplo de amplificación mediante PCR con cebadores degenerados sobre DNA genómico de *Aspergillus carbonarius*. Carril 1: amplificación mediante los cebadores p450 CARB 1F/ p450 CARB 1R, carril 2: amplificación mediante los cebadores p450 CARB 2F/ p450 CARB 2R, M: Marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb. La flecha indica la banda de tamaño esperado cuyo DNA mostró homología con miembros de la superfamilia de citocromos P450 de hongos filamentosos del GenBank.

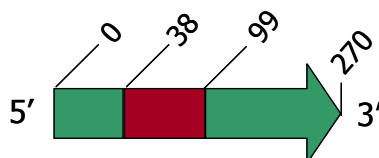
De las secuencias obtenidas, únicamente uno de los clones presentó homología con miembros de la superfamilia de citocromos P450 de hongos filamentosos del GenBank, con una identidad entre el 87% ( $E=2e-26$ ) y el 40% ( $E=0,002$ ). La mayor homología ( $E=2e-26$ ) correspondió a una monooxigenasa P450 de *A. niger* de función desconocida (XP\_001396344), diferente a la obtenida en el caso anterior cuando se introducía la secuencia del gen *aocrp450* de *A. ochraceus*.

La secuencia presentaba una longitud de 270 pb, con una región codificadora de 208 pb. Debido a su pequeño tamaño, fue sencillo deducir la posición del intrón por sus características típicas (Unkles, 1992; Gurr *et al.*, 1987) y la comparación con otros fragmentos equivalentes de cepas de *Aspergillus* del GenBank.

Este fragmento de gen, al que llamaremos *acarp450*, presenta un intrón, situado en las posiciones 38 a 99 de la secuencia genómica. La secuencia obtenida, así como la secuencia de aminoácidos deducida utilizando el programa EditSeq (Larsegene, Estados Unidos), se representan en la Figura 3.23. En la Figura 3.24 se muestra un esquema de la estructura del fragmento del gen *acarp450* y la posición de su intrón.

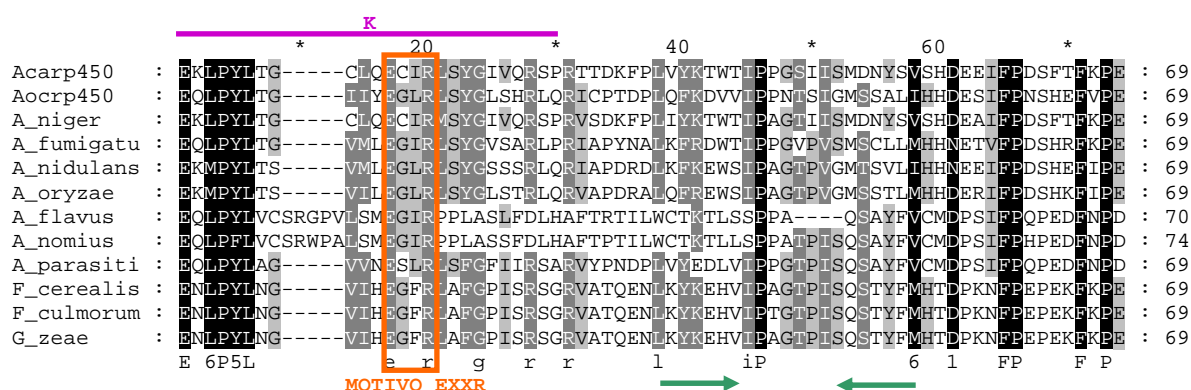
	GAAAAGCTTCCGTACCTGACGGGTTGTCTCCAAGAAT	<b>gtacataaacccactccgtccc</b>	60
1	E K L P Y L T G C L Q E		
	ccacaacccaccaaccga	<b>aactaacacctaactccccag</b>	120
13		C I R L S Y G	
	TAGTTCAACGCTCGCCCCGCACAACCGACAAATTTCCCTCGTGACAAAACCTGGACCA		180
20	I V Q R S P R T T D K F P L V Y K T W T		
	TCCCCCGGGCTCCATAATCAGCATGGATAACTACTCCGTCTCCCATGACGAAGAAATTT		240
40	I P P G S I I S M D N Y S V S H D E E I		
	TCCCCGACTCATTACCTTCAAGCCCGAGC		270
60	F P D S F T F K P E		

**Figura 3.23.** Secuencia de nucleótidos del gen *acarp450* (en negro) y aminoácidos de su correspondiente polipéptido (en verde). El intrón se diferencia en letra roja y minúscula, resaltándose en negrita las secuencias implicadas en su procesamiento. Los nucleótidos y aminoácidos aparecen numerados a la derecha y a la izquierda, respectivamente.



**Figura 3.24.** Esquema de la estructura del fragmento del gen *acarp450* en *A. carbonarius*. Los números corresponden a la situación del intrón y exones en pb.

La región codificadora del gen *acarp450* corresponde a un pequeño fragmento polipeptídico de 69 aminoácidos. En la Figura 3.25 se muestra el alineamiento de esta secuencia de aminoácidos con la región equivalente de la proteína citocromo P450 obtenida en *A. ochraceus*, y con otros fragmentos de proteínas citocromo P450 de otras especies de hongos del GenBank. Cabe destacar, como esperábamos, su elevada homología con la secuencia de *A. niger* (XP\_001396344), con la que llega a presentar, en esa zona, el 87% de similitud. La secuencia mostró una de las regiones conservadas para proteínas P450, el motivo E-X-X-R, que se encuentra en la  $\alpha$ -hélice K (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).



**Figura 3.25.** Alineamiento mediante el método CLUSTAL de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *acarp450* con la secuencia de *A. ochraceus aocrp450* y con citocromos de la superfamilia p450 de *A. niger* (XP\_001396344), *A. fumigatus* (XP\_748206), *A. nidulans* (XP\_659398), *A. oryzae* (XP\_001817189), *A. flavus* (AAS89997), *A. nomius* (AAS90045), *A. parasiticus* (AAS66021), *F. cerealis* (AAM48764), *F. culmorum* (AAM49028) y *Gibberella zeae* (AAM48748). Los residuos iguales se resaltan sobre fondo negro y los similares sobre gris. El dominio de hélice K se indica en rosa encima de la secuencia. También se indican los aminoácidos altamente conservados del motivo EXXR (recuadro naranja). Las zonas de diseño de cebadores para PCR cuantitativa aparecen representadas con flechas verdes en la parte inferior de las secuencias.

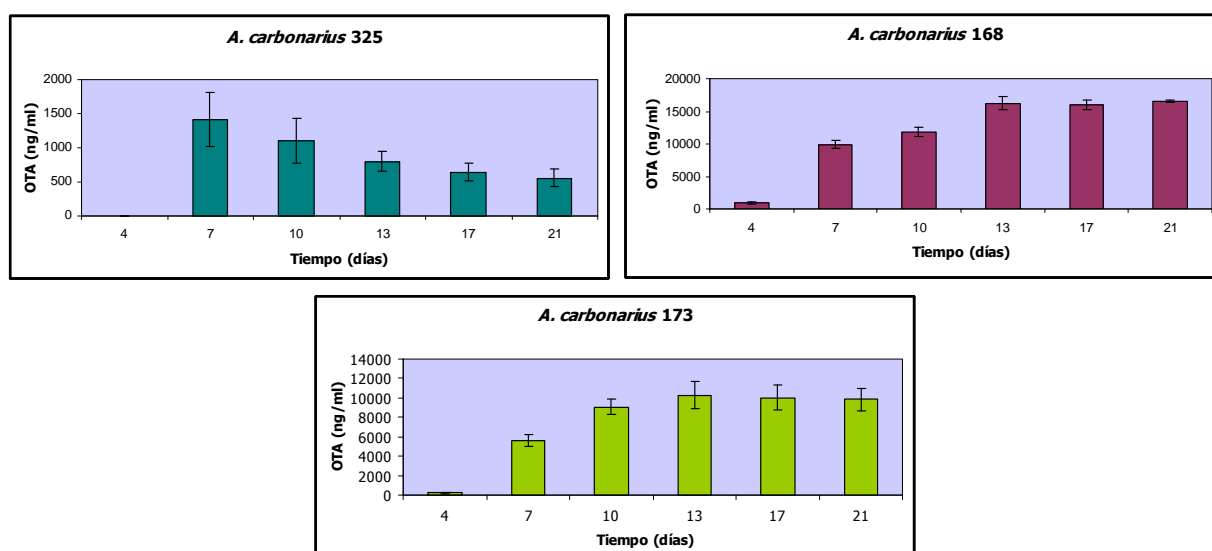
Una vez obtenido este fragmento, se intentó ampliar por los extremos combinando cebadores diseñados en base a la secuencia obtenida con cebadores degenerados, tanto en DNA genómico como cDNA, o bien mediante PCR inversa (Ochman *et al.*, 1998), pero con ninguna de las técnicas se consiguió amplificar algún fragmento que contuviese el gen deseado.

## 5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *p450* Y *AcKS9* DE *A. carbonarius* MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL

### 5.1. CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR *A. carbonarius* EN UN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Como paso previo a la cuantificación de la expresión del gen *acarp450* en relación a la producción de OTA para averiguar si podría estar implicado en su ruta de biosíntesis, era necesario establecer las condiciones de producción en cultivos sólidos y definir situaciones permisivas y restrictivas para la producción de toxina. Ambos medios y condiciones de producción (CYA pH 6,0, 20°C) y no producción (YES pH 8,3, 28°C) se encuentran descritos en el Apartado 8 de "Material y Métodos".

Para establecer la cinética de producción de OTA se cultivaron las cepas de *A. carbonarius* 325, 168 y 173 por triplicado en CYA durante 4, 7, 10, 13, 17 y 21 días, a 20°C, como también se describe en el apartado "Material y Métodos". Así mismo, se cultivaron los mismos aislamientos en YES durante los mismos días pero a 28°C, para comprobar que realmente eran condiciones restrictivas y no se producía toxina. Una vez finalizado el período de incubación se valoró la concentración de OTA en los extractos realizados según el protocolo indicado en el Apartado 11 de "Material y Métodos". Los resultados se muestran en la Figura 3.26.



**Figura 3.26.** Concentración de OTA (ng/ml) producida por *A. carbonarius* 325, 168 y 173 tras diferentes días de cultivo en CYA a 20°C. Los experimentos se realizaron por triplicado y el resultado en cada caso se muestra como los valores medios con sus correspondientes barras de desviación estándar.

En la Figura 3.26 podemos observar que la producción de OTA alcanza un máximo valor al cabo de 7-13 días de cultivo, momento a partir del cual los valores de producción se mantienen (*A. carbonarius* 168 y 173) o bien comienzan a decaer (*A. carbonarius* 325). Los valores de producción también reflejan comportamientos diferentes, siendo la cepa 325 menos productora que las cepas 168 y 173.

Las mismas cepas cultivadas en medio YES a 28°C no produjeron en ningún caso cantidades detectables de OTA a lo largo de todo el experimento, lo que confirma que las condiciones descritas se pueden establecer como permisivas y restrictivas para la producción de OTA.

### 5.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *acarp450* Y *AckS9* EN RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL

Para determinar si la monooxigenasa ACARP450, obtenida en *A. carbonarius*, pudiera estar relacionada con la producción de OTA, analizamos la expresión del gen que la codifica en los cultivos de las cepas de *A. carbonarius* 168, 173, 325 y MUM 04.01 durante 5 días en medio sólido de producción CYA, y se comparó con la de las mismas cepas en condiciones de no producción (medio YES). Se escogió un periodo de incubación de cinco días porque, aunque las cantidades de OTA detectadas en el medio son pequeñas (ver Figura 3.26), los genes responsables o relacionados con su síntesis se suelen expresar con anterioridad al máximo de producción de la toxina, y además es preferible partir de micelios jóvenes para las extracciones de RNA. Las secuencias de los cebadores diseñados para amplificar el gen *acarp450* se encuentran en la Tabla 2.6 de "Material y Métodos", y su situación con respecto al alineamiento de aminoácidos aparece representada en la Figura 3.25. Se elaboró a su vez el alineamiento de nucleótidos de las secuencias descritas en esa figura, con el objetivo de verificar que los cebadores se diseñaban en dos zonas muy poco conservadas, lo que disminuye las posibilidades de amplificación de otros genes de citocromos P450 presentes en *A. carbonarius*.

Además de la expresión del gen codificador de la proteína citocromo P450, diseñamos unos cebadores para analizar la expresión del gen *AckS9*, obtenido del GenBank

(AY540944) y descrito por Atoui *et al.* en 2006 en *A. carbonarius*. Este gen codifica una proteína poliquétido sintasa, cuya función está relacionada con la producción de OTA, y fue seleccionado debido a que mostró una cierta expresión diferencial en el medio de producción y no producción en experimentos preliminares. Al igual que en el caso anterior, las secuencias de los cebadores diseñados para amplificar el gen *AcKS9* se encuentran en la Tabla 2.6 de "Material y Métodos". Para evitar la amplificación inespecífica de otros genes codificadores de PKS de *A. carbonarius* con nuestros cebadores, éstos se diseñaron en zonas no conservadas de los genes, y se alineó la secuencia de varios genes *pks* incluidos, así mismo, en Atoui *et al.* (2006), junto con otros *pks* presentes en el GenBank para *A. carbonarius* (6 secuencias en total) (Apartado 9.4 de "Material y Métodos").

La técnica elegida fue la PCR a tiempo real de los cDNAs obtenidos a partir del RNA de los micelios. En primer lugar, construimos una curva estándar utilizando diluciones decimales de una muestra de concentración conocida para cada uno de los genes problema, así como para el gen *tub2*, que codifica para la  $\beta$ -tubulina, que es un control endógeno o gen constitutivo ("housekeeping") amplificado en la misma placa, utilizado como referencia para normalizar los resultados (Ginzinger, 2002). Los cebadores diseñados para amplificar este gen se encuentran, nuevamente, en la Tabla 2.6 de "Material y Métodos".

Las curvas se obtenían, como en el caso de la PCR a tiempo real para detección y cuantificación de DNA, representando los valores de  $C_T$  frente al logaritmo de la cantidad de molde de cada dilución. En la Tabla 3.9 se muestran los valores de la eficiencia de la amplificación en cada caso, dada por los valores de la pendiente de la recta obtenida para cada gen, y el coeficiente de correlación  $R^2$ .

	$\beta$ -tubulina	<i>acarp450</i>	<i>AcKS9</i>
PENDIENTE	-3,49	-3,47	-3,40
$R^2$	0,996	0,998	0,997

**Tabla 3.9.** Pendiente y coeficiente de correlación de la curva estándar obtenida para cada gen.



En la Tabla 3.9 podemos observar, en primer lugar, que la pendiente de todas las curvas tiene un valor en torno a -3,44, que es el valor que corresponde a una eficiencia de la amplificación del 95%. En todos los casos, obtuvimos una eficiencia de la amplificación superior al 90%. Además, la diferencia entre la pendiente del gen endógeno y la de los genes problema es menor de 0,1, lo que nos permite aplicar el método del  $\Delta\Delta C_T$  para la cuantificación relativa de los niveles de expresión ya que, para poder utilizar este método, las eficiencias de la amplificación del gen constitutivo y del gen problema deben ser aproximadamente iguales. (User Bulletin Nº 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, 1997, [http://dna9.intmed.uiowa.edu/Realtime PCRdocs/Compar\\_Anal\\_Bulletin2.pdf](http://dna9.intmed.uiowa.edu/Realtime PCRdocs/Compar_Anal_Bulletin2.pdf)).

El método del  $\Delta\Delta C_T$  consiste en lo siguiente: el valor  $\Delta C_T$  se determina restando la media de los valores  $C_T$  obtenidos para el gen endógeno de la media de los valores  $C_T$  del gen problema. Su desviación estándar se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\sqrt{s_1^2 + s_2^2},$$

donde  $s_1$  y  $s_2$  son las desviaciones estándar de los genes problema y endógeno, respectivamente. El cálculo del valor  $\Delta\Delta C_T$  implica restar a cada  $\Delta C_T$  el valor del  $\Delta C_T$  de un calibrador, que es una muestra utilizada como base para los resultados relativos. Al ser una resta de un valor arbitrario, la desviación del  $\Delta\Delta C_T$  es la misma que la del  $\Delta C_T$ . Una vez obtenidos estos valores, la cantidad de un gen problema, normalizado a una referencia endógena y relativa a un calibrador, viene dada por la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Para asegurar que las amplificaciones eran obtenidas a partir del cDNA y no de restos de DNA genómico no eliminado por el tratamiento con DNasa I, previo a las reacciones de retrotranscripción, se realizaron reacciones de PCR control en las que como molde se utilizaron los RNAs extraídos. El tratamiento con DNasa I se repetía, si era necesario, hasta que en todos los casos se obtenía una amplificación nula, de manera que el RNA molde para las reacciones de retrotranscripción estuviese totalmente libre de DNA genómico. Además, para comprobar la integridad del cDNA y confirmar la ausencia de DNA genómico, se amplificó un fragmento del gen de la calmodulina empleando los cebadores que se describen en el Apartado 9.3 de "Material y Métodos", los cuales, al contener en su interior un intrón, amplifican un fragmento de distinto tamaño en el DNA genómico y en el cDNA. En todos los casos, el tamaño del fragmento correspondió a lo esperado para cDNA, y no se observaron bandas

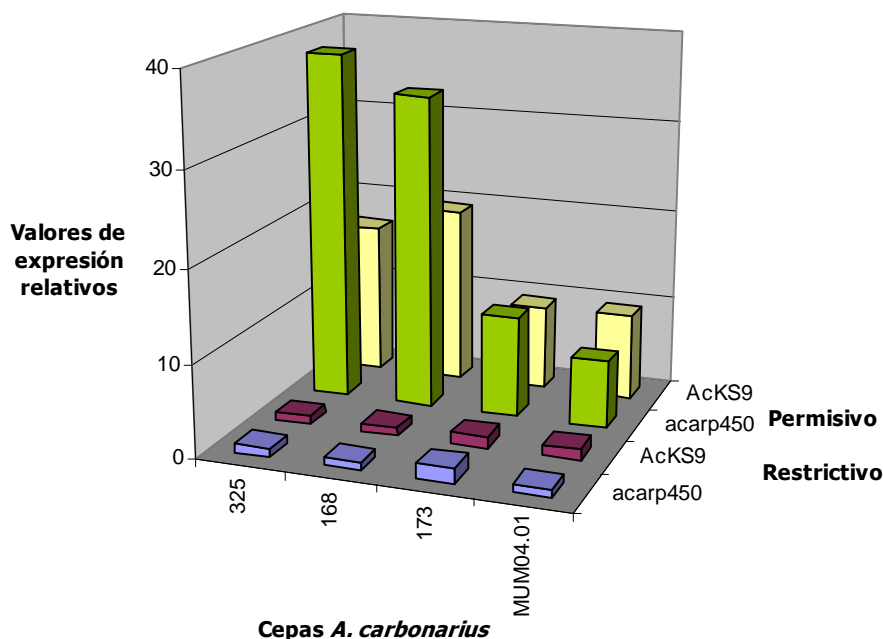
secundarias de amplificación de DNA genómico en ningún caso, por lo que todo el producto de amplificación generado a partir de cada muestra era debido exclusivamente al cDNA.

Por otra parte, en todas las muestras el valor de  $C_T$  obtenido para el gen de la  $\beta$ -tubulina fue similar, lo que indicaba que las amplificaciones se desarrollaron de forma correcta y que en todas las reacciones se partió de cantidades similares de cDNA. En cada réplica de PCR, la desviación estándar nunca superó el 2,2%.

La cuantificación de la transcripción de los genes *acarp450* y *AckS9* en las diferentes cepas de *A. carbonarius*, cultivadas durante 5 días en condiciones inductoras (CYA, pH 6,0, 20°C) y represoras de síntesis de OTA (YES, pH 8,3, 28°C), y relativa al valor obtenido para la cepa 325 cultivada en medio restrictivo, se muestran en la Tabla 3.10. También se muestra la cantidad de OTA producida en cada caso, al cabo de 5 días. Los valores de expresión relativos para ambos genes y en las cuatro cepas se representan en la Figura 3.27.

CEPA	MEDIO	<i>acarp450</i>	<i>AckS9</i>	OTA (ng/ml)
325	RESTRICTIVO	<b>1 ± 0,05</b>	<b>1 ± 0,21</b>	ND
	PERMISIVO	<b>38,15 ± 8,64</b>	<b>16,67 ± 6,92</b>	<b>40,46 ± 16,8</b>
168	RESTRICTIVO	<b>0,82 ± 0,11</b>	<b>0,97 ± 0,14</b>	ND
	PERMISIVO	<b>34,31 ± 13,8</b>	<b>19,41 ± 5,44</b>	<b>57 ± 30,6</b>
173	RESTRICTIVO	<b>1,64 ± 0,76</b>	<b>1,23 ± 0,87</b>	ND
	PERMISIVO	<b>11,08 ± 3,94</b>	<b>9,27 ± 2,76</b>	<b>4,6 ± 4,4</b>
MUM 04.01	RESTRICTIVO	<b>0,76 ± 0,04</b>	<b>1,22 ± 0,33</b>	ND
	PERMISIVO	<b>7,33 ± 1,13</b>	<b>9,46 ± 1,91</b>	<b>13,7 ± 2,47</b>

**Tabla 3.10.** Valores de expresión relativos de los genes *acarp450* y *AckS9* en las cepas productoras de OTA de *A. carbonarius* 325, 168, 173 y MUM 04.01 cultivadas en medios sólidos en condiciones de producción (permisivas, medio CYA) y no producción (restrictivas, medio YES) de OTA durante 5 días a 20 y 28°C respectivamente. Los datos han sido normalizados con los valores de  $C_T$  obtenidos para el gen de la  $\beta$ -tubulina y, posteriormente, han sido divididos por el valor del calibrador, al que se le asigna el valor de 1. En este caso, como calibrador se ha utilizado la expresión de la cepa 325 en medio restrictivo. El experimento se realizó por triplicado, y se muestran las medias  $\pm$  la desviación estándar en cada caso. Así mismo, se muestran los correspondientes valores medios y desviaciones estándar de producción de OTA para cada experimento, tras 5 días de incubación.



**Figura 3.27.** Representación gráfica de los valores de expresión relativos de los genes *acarp450* y *AckS9* en las cepas productoras de OTA de *A. carbonarius* 325, 168, 173 y MUM 04.01, cultivadas 5 días en medios sólidos permisivo y restrictivo para la producción de OTA. A la muestra de la cepa 325 en medio restrictivo se le asigna el valor de 1. Se muestran las medias de tres experimentos en cada caso.

Como se puede apreciar en la Tabla 3.10, los niveles relativos de expresión de ambos genes se corresponden con la producción de OTA de cada cepa. Los mayores niveles de expresión corresponden a las cepas 325 y 168 (Figura 3.27), que son las que alcanzan los valores más altos de acumulación de OTA en el medio hasta ese momento. La menor transcripción corresponde a las cepas 173 y MUM 04.01 (Figura 3.27), las cuales acumulan menos OTA hasta el momento de la medición.

El citocromo *acarp450* presenta un patrón de expresión que coincide con el del gen *AckS9*, es decir, los mayores valores de transcripción se obtuvieron para las cepas que produjeron una mayor cantidad de OTA, aunque la inducción de la expresión del gen *acarp450* en condiciones de producción de OTA es, en general, mayor que la del *AckS9*, especialmente en las cepas 325 y 168.

Para valorar el grado de asociación entre la producción de OTA y la expresión relativa de los genes *acarp450* y *AckS9*, calculamos el coeficiente de correlación de Spearman,

utilizando el programa SAS 9.1 (SAS Inc., Estados Unidos). Obtuvimos correlaciones positivas entre la producción de OTA a los 5 días de cultivo y los niveles de expresión relativos de los genes *acarp450* y *AckS9*, con valores de 0,88 y 0,93, respectivamente. También obtuvimos una correlación positiva (0,85) entre los niveles de expresión relativos de ambos genes. En cuanto a la expresión de los dos genes en condiciones permisivas y restrictivas de producción de OTA, las amplificaciones mostraron valores relativos cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,1$ ), mediante el uso del mismo programa, SAS 9.1 (SAS Inc., Estados Unidos).

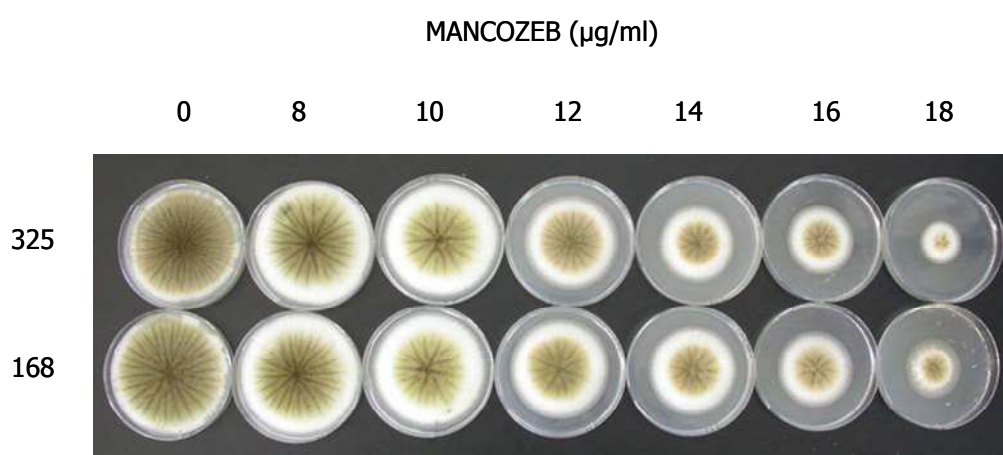
## **6. EFECTO DE LOS FUNGICIDAS MANCOZEB Y BENOMILO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE OTA Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *acarp450* Y *AckS9* MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL**

Ciertos fungicidas pueden controlar el crecimiento de un hongo pero no así la síntesis de diferentes metabolitos secundarios como las micotoxinas. Debido a que habíamos comprobado previamente que la expresión de los genes *acarp450* y *AckS9* parecían estar relacionados con la síntesis de OTA, nos planteamos estudiar la producción de OTA y los niveles de transcripción relativa de dichos genes en presencia de distintas concentraciones de fungicidas de uso común.

Con el fin de valorar el efecto de los fungicidas comerciales seleccionados sobre la síntesis de OTA en *A. carbonarius*, valoramos tanto la producción de toxina, medida mediante HPLC, como los niveles de expresión de los genes *acarp450* y *AckS9* mediante PCR a tiempo real en presencia de dichas sustancias.

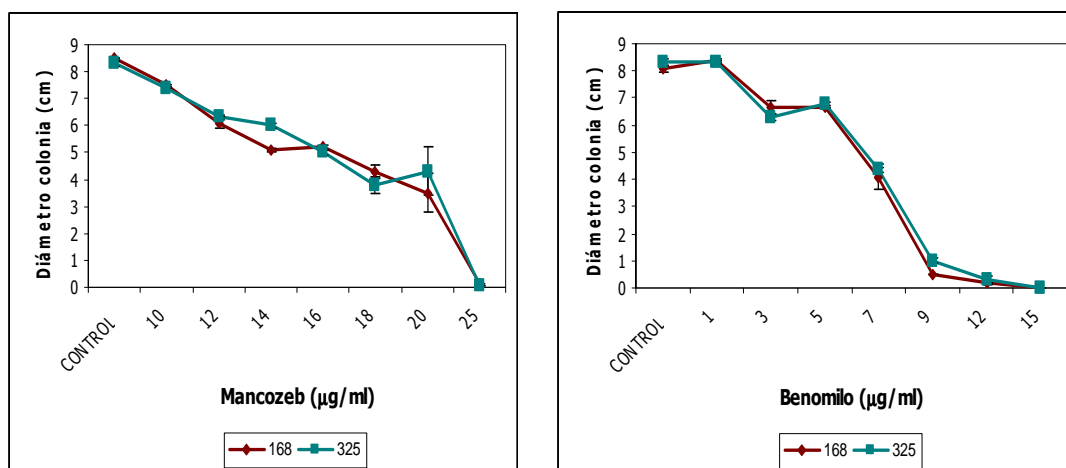
En primer lugar realizamos una curva de crecimiento de los hongos con cada uno de los fungicidas utilizados (ver Tabla 2.7 de "Material y Métodos"). Para ello, cultivamos las diferentes cepas añadiendo al medio de cultivo concentraciones crecientes de cada fungicida hasta alcanzar la dosis letal, en las condiciones indicadas en el Apartado 10 de "Material y Métodos". Los medios de cultivo utilizados fueron, como en el caso anterior, el medio permisivo CYA a pH 6,0 y el restrictivo YES a pH 8,3, pero en este caso la temperatura de incubación fue la misma (28°C), con el objetivo de obtener más micelio para las extracciones de RNA.

Los hongos incluidos en el estudio fueron las cepas de *A. carbonarius* productoras de OTA 325 y 168, por ser los que presentaban los valores de producción de OTA más elevados. Una vez finalizado el periodo de incubación (5 días), se midió el diámetro de los hongos incubados con fungicidas en cada caso, así como el diámetro de los hongos cultivados en condiciones control (sin fungicida). La Figura 3.28 muestra un ejemplo del resultado de crecimiento radial de ambas cepas 325 y 168 en presencia de diferentes concentraciones del fungicida mancozeb.



**Figura 3.28.** Crecimiento de *A. carbonarius* 325 y 168 en presencia de concentraciones crecientes de mancozeb en medio permisivo CYA tras 5 días de crecimiento a 28°C.

En la Figura 3.29 se representa el crecimiento de las cepas 325 Y 168 en medio CYA en presencia de concentraciones crecientes de los fungicidas mancozeb y benomilo. Se realizaron tres experimentos en cada situación, y la representación gráfica corresponde a la media de los tres valores de diámetro obtenidos en cada punto. Las barras de error representan la desviación típica. No se incluyen los datos de crecimiento en YES con fungicida, debido a que en ese medio se observó una inhibición completa por parte de éstos a cualquier concentración. Sin embargo, el medio YES sin adición de fungicida sí que se ha incluido en el estudio, como control de la expresión negativa de los genes. Tampoco se incluyen los resultados del fungicida cola de caballo, al quedar descartado por problemas de contaminación proveniente del propio *stock* de fungicida.



**Figura 3.29.** Crecimiento de *A. carbonarius* 168 (rojo) y 325 (azul) en CYA en presencia de los fungicidas mancozeb y benomilo añadidos al medio de cultivo. Los hongos se cultivaron durante 5 días a 28°C. El crecimiento en cada punto viene dado como el diámetro de la colonia en centímetros. Se representan las medias y las desviaciones estándar (barras de error) de los experimentos para cada cepa realizados por triplicado.

En las gráficas de la Figura 3.29 podemos observar que el comportamiento de las dos cepas en presencia de los dos compuestos fue muy parecido, es decir, a una concentración dada de un mismo tóxico el diámetro obtenido fue similar en ambos casos. Por otra parte, las dosis letales fueron las mismas para las dos cepas. Las diferencias entre los diámetros obtenidos en ambas cepas fueron estadísticamente no significativas ( $P > 0,05$ ) para ambos fungicidas, usando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Estados Unidos).

En cuanto a las diferencias entre los dos fungicidas, se observó que la toxicidad con mancozeb fue progresiva, mientras que la adición de benomilo presentó una disminución de crecimiento muy acusada entre un rango estrecho de concentraciones. Las cepas utilizadas en este estudio resultaron ser más resistentes a mancozeb que a benomilo, con una concentración mínima inhibitoria de 25 y 15 µg/ml, respectivamente.

Las curvas de diámetros de crecimiento en función de la concentración nos permitieron seleccionar dos concentraciones de cada fungicida en la que extraer el RNA del micelio (Tabla 3.11).

TRATAMIENTO	[FUNGICIDA] (µg/ml)	NOMBRE	CRECIMIENTO (%)	
			325	168
Control no producción OTA (sin fungicida)	-	Control (-)	100	100
Control producción OTA (sin fungicida)	-	Control (+)	100	100
Mancozeb	10	M10	89	88
	16	M50	59	60
Benomilo	2,5	B10	87	92
	7	B50	58	57

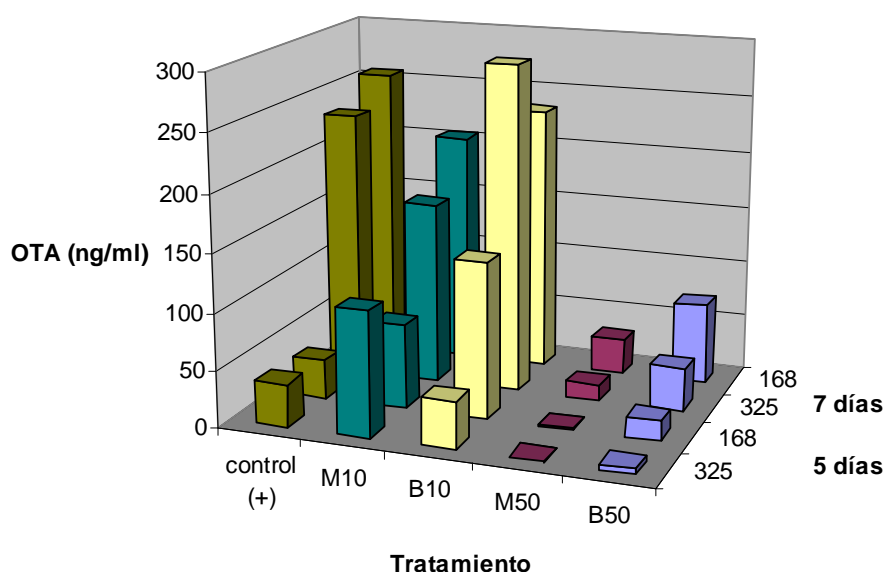
**Tabla 3.11.** Fungicidas añadidos al medio de cultivo, concentraciones de fungicida seleccionadas para la cuantificación de la producción de OTA y de los niveles de expresión de los genes *acarp450* y *AckS9*, nomenclatura usada en cada caso, y efecto sobre el crecimiento a esa concentración (porcentaje respecto al control) en las cepas 325 y 168, calculado a partir de las curvas de la Figura 3.29.

Para los experimentos de RT-PCR a tiempo real y concentración de OTA, se eligieron los puntos en los que crecimiento se reducía en un 10-20% y en un 40-50%. A dichas concentraciones las llamaremos: M10 y M50, cuando las concentraciones de mancozeb fueron de 10 y 16 µg/ml, en las que crecimiento se reduce en un 10% y en un 50% respectivamente, y B10 y B50 cuando las concentraciones de benomilo fueron de 2,5 y 7 µg/ml, en las que crecimiento se reduce en un 10% y en un 50% respectivamente.

Los resultados de producción de OTA para cada experimento tras 5 días de incubación en condiciones control y para cada fungicida añadido se muestran en la Tabla 3.12, y su representación gráfica en la Figura 3.30. Para comprobar la evolución de la producción de OTA en presencia de fungicidas, se midió su concentración en las mismas condiciones al cabo de 7 días. Los resultados obtenidos aparecen, a su vez, en la Tabla 3.12 y en la Figura 3.30.

MEDIO DE CULTIVO	TRATA-MIENTO	OTA 5 días (ng/ml)		OTA 7 días (ng/ml)	
		325	168	325	168
YES, pH 8,3 (CONTROL NO PRODUCCIÓN)	Control (-)	ND	ND	ND	ND
CYA, pH 6,0 (CONTROL PRODUCCIÓN)	Control(+)	37,03 ± 4,2	34,1 ± 5,6	234 ± 60,2	257,9 ± 7,4
CYA + MANCOZEB	M10	108,75 ± 10,85	73,8 ± 28,8	160,3 ± 20,1	204 ± 10,2
	M50	0,6 ± 0,6	1 ± 0,3	14,2 ± 5,1	31,9 ± 9,3
CYA + BENOMILO	B10	41,27 ± 4,2	136,8 ± 23,7	288,3 ± 37,1	234 ± 4,2
	B50	4,39 ± 1,25	17,68 ± 1,07	38,2 ± 7,4	71,5 ± 13,6

**Tabla 3.12.** Valores de producción de OTA para cada medio control (YES para no producción y CYA para producción) y para CYA con la adición de fungicidas a dos concentraciones, tras 5 días y 7 días de incubación a 28°C. Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar de dos experimentos independientes.



**Figura 3.30.** Representación gráfica de los valores de producción de OTA (ng/ml) frente al tratamiento aplicado y el tiempo de incubación (5 ó 7 días), en cada una de las cepas de *A. carbonarius* 325 y 168. Se muestra la media de dos experimentos independientes en cada caso.



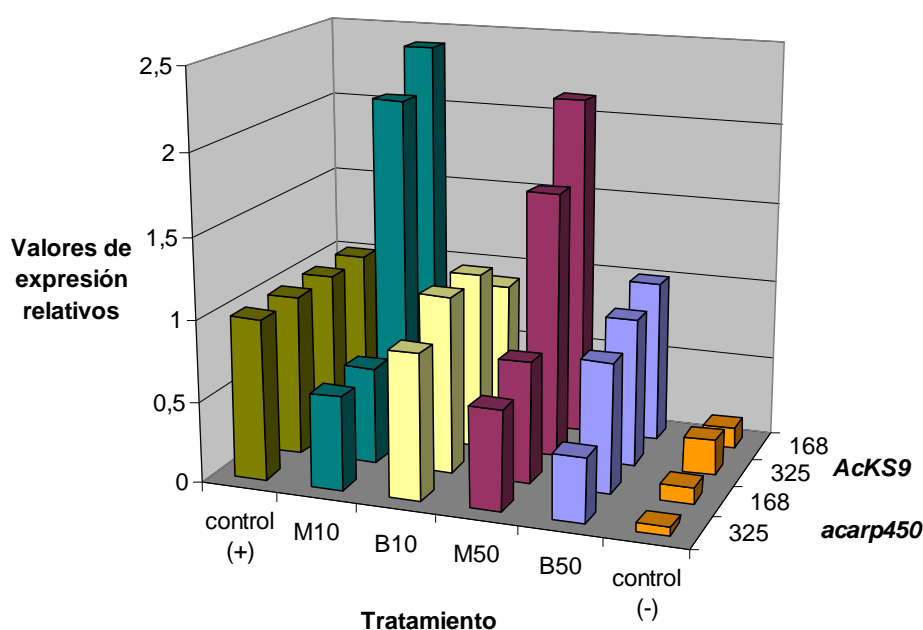
Como se puede apreciar, los valores de producción de OTA a los 5 días se ven reducidos drásticamente al añadir una concentración de fungicida que disminuye el crecimiento al 50%, mientras que a bajas concentraciones de fungicida la concentración de OTA es mayor que en el control. Para observar la evolución de este comportamiento en el tiempo, se efectuaron las mismas medidas de OTA al cabo de 7 días de crecimiento. En este caso, la concentración de OTA tanto a dosis altas como bajas de fungicida es menor que en el control, excepto para el benomilo a la concentración B10 en la cepa 325.

Los valores de cuantificación de la expresión génica obtenidos mediante PCR a tiempo real se calcularon de la misma forma que en el apartado anterior (Apartado 5.2). La cantidad de mensajeros de los genes *acarp450* y *AckS9* en cada muestra se normalizó utilizando los valores de  $C_T$  obtenidos para el mRNA del gen de la  $\beta$ -tubulina, utilizado como gen endógeno, amplificado en la misma placa. Posteriormente su valor se relativizó con respecto a un calibrador, al que se asigna el valor 1, y que en este caso corresponde al cultivo control de producción (+) realizado con la cepa 325.

En la Tabla 3.13 y Figura 3.31 se muestran los resultados de los niveles de expresión relativos de los genes *acarp450* y *AckS9*, respectivamente, tras 5 días de incubación, en ambas cepas 325 y 168. Los resultados corresponden a la media de dos experimentos independientes. Los valores representan el número de veces que los genes se expresan en comparación con el control (calibrador). Se muestran las medias  $\pm$  las correspondientes desviaciones estándar en cada caso.

MEDIO DE CULTIVO	TRATAMIENTO	<i>acarp450</i>		<i>AcKS9</i>	
		325	168	325	168
YES, pH 8,3 (CONTROL NO PRODUCCIÓN)	Control (-)	<b>0,05</b> ± 0,02	<b>0,1</b> ± 0,02	<b>0,22</b> ± 0,02	<b>0,13</b> ± 0,02
CYA, pH 6,0 (CONTROL PRODUCCIÓN)	Control (+)	<b>1</b> ± 0,2	<b>0,98</b> ± 0,03	<b>1</b> ± 0,17	<b>1,03</b> ± 0,54
CYA + MANCOZEB	M10	<b>0,58</b> ± 0,07	<b>0,6</b> ± 0,06	<b>2,15</b> ± 0,05	<b>2,4</b> ± 0,31
	M50	<b>0,62</b> ± 0,13	<b>0,75</b> ± 0,04	<b>1,65</b> ± 0,35	<b>2,13</b> ± 0,03
CYA + BENOMILO	B10	<b>0,9</b> ± 0,05	<b>1,1</b> ± 0,15	<b>1,1</b> ± 0,2	<b>0,9</b> ± 0,08
	B50	<b>0,4</b> ± 0,05	<b>0,8</b> ± 0,08	<b>0,92</b> ± 0,35	<b>1,01</b> ± 0,1

**Tabla 3.13.** Cuantificación de los niveles de transcripción relativos de los genes *acarp450* y *AcKS9* en las cepas de *A. carbonarius* 325 y 168, tras 5 días de incubación a 28°C, en condiciones control y en presencia de diferentes concentraciones de los fungicidas mancozeb y benomilo. Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar de dos experimentos independientes.



**Figura 3.31.** Representación gráfica de los valores de expresión relativos de los genes *AcKS9* y *acarp450* en cada una de las cepas de *A. carbonarius* 325 y 168, tras 5 días de incubación a 28°C, frente al tratamiento aplicado. Se muestra la media de dos experimentos independientes en cada caso.

En primer lugar, podemos observar, tanto en la Tabla 3.13 como en la Figura 3.31, que para ambos genes *acarp450* y *AckS9* existe un aumento de expresión, como cabría esperarse, en condiciones permisivas de producción de OTA (control +), frente a las restrictivas (control -), tras 5 días de incubación.

Por otra parte, la aplicación de los fungicidas tiene un efecto desigual sobre la expresión de ambos genes. Así, mientras que la expresión del gen *AckS9* no se ve apenas afectada con las dos concentraciones de benomilo, B10 y B50, manteniendo valores similares de expresión respecto al control positivo, el mancozeb parece producir un efecto inductor de la expresión de *AckS9*. En el caso del gen *acarp450*, la aplicación de ambos fungicidas produce una ligera disminución de la expresión en todos los casos, excepto en el caso de la concentración de benomilo B10, en el que es similar.

Para determinar si existían diferencias significativas entre la expresión de los controles con respecto a las muestras tratadas con fungicida, se aplicó el test de Kruskal-Wallis utilizando el programa "SAS 9.1" (SAS Inc., Estados Unidos). Los resultados obtenidos no reflejaron diferencias significativas entre los controles de producción y las muestras tratadas con fungicida en ningún caso ( $P > 0,05$ ), ni para la comparación entre los valores relativos obtenidos con ambas dosis de fungicidas, realizado mediante el Test de Wilcoxon y mediante el uso del mismo programa.

## DISCUSIÓN

---



## 1. ENSAYOS DE PCR ESPECÍFICOS PARA ESPECIES DE *Aspergillus* TOXÍGENAS

### 1.1. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE *A. ochraceus* Y ESPECIES DE *Aspergillus* PERTENECIENTES A LA SECCIÓN *Nigri*

A lo largo de la realización del primer objetivo, se han ido desarrollando ensayos de PCR específicos para las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA (*A. ochraceus*, *A. carbonarius* y agregado *A. niger*), así como para las demás especies incluidas en la sección *Nigri*: *A. japonicus*, *A. heteromorphus* y *A. ellipticus*. Con el objetivo de asegurar el carácter monofilético de estas especies, su grado de variabilidad intraespecífica y la inclusión en el estudio de las especies relacionadas en mayor o menor grado, se tuvieron en cuenta los estudios publicados en aquel momento sobre esas especies y grupos o secciones implicadas. En algunos casos, se realizaron estudios filogenéticos parciales incluyendo de forma especial cepas de diversos orígenes de España (González-Salgado, 2004).

La región diana para la búsqueda de cebadores adecuados ha sido la región espaciadora del rDNA, ITS, la cual, como se ha indicado en la introducción, presenta niveles de variabilidad adecuados para la discriminación de especies próximas, y una variación casi nula a nivel intraespecífico. Así, la comparación de secuencias de cepas de *Aspergillus* reveló la existencia de poca variabilidad entre ellas, tanto en el caso de la especie *A. ochraceus* como en el de los miembros de la sección *Nigri*, y una clara distinción interespecífica entre las especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri*: *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus* y agregado *A. niger*, que incluye las especies *A. niger* y *A. tubingensis*. En el caso de *A. heteromorphus*, sin embargo, sólo se pudo encontrar una única cepa en las distintas colecciones de cultivo utilizadas. El escaso número existente de cepas de esta especie puede ser debido a la dificultad de distinción, mediante métodos tradicionales, de especies dentro de esta sección, o bien a su ausencia en sustratos relacionados con productos agro-alimentarios. El ensayo de PCR elaborado para *A. heteromorphus* podrá contribuir a su reconocimiento y, por tanto, a la determinación de su distribución, presencia e importancia relativa en diversos sustratos.

La especificidad de cada ensayo de PCR ha sido evaluada en un amplio número de aislamientos de *Aspergillus* de diversos orígenes, así como en otros hongos normalmente asociados con uvas, cereales y café, como los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Botrytis* y *Alternaria* (ver Tablas 3.1 y 3.2 de "Resultados"). Las diversas localizaciones geográficas y el origen de los aislamientos analizados pueden ser considerados como representativos de la variabilidad de estas especies.

El producto de PCR para la detección de cepas del agregado *A. niger* incluye una diana para la endonucleasa de restricción *Afa* I, que permite diferenciar si se trata de una cepa de *A. niger* o de *A. tubingensis*. (Accensi *et al.*, 1999) (ver Figura 3.7 de "Resultados"). Únicamente hemos encontrado un ensayo mediante PCR, también basado en la región ITS, para la detección del agregado *A. niger* (Sugita *et al.*, 2004). Sin embargo, en este caso no es posible la distinción posterior, como en el nuestro, de las especies *A. niger* y *A. tubingensis*. La diferencia entre ambas especies ya había sido señalada durante los años 90 en diversos estudios de DNA mitocondrial y DNA ribosómico (Varga *et al.*, 1993, 1994; Parenicová *et al.*, 1997), y se ha visto confirmada posteriormente mediante el uso tanto de las mismas secuencias diana (Martínez-Culebras y Ramón, 2007; Juhász *et al.*, 2008), como de otras, como el gen de la calmodulina (Susca *et al.*, 2007a; Susca *et al.*, 2007b), o el estudio mediante perfiles de AFLPs (Perrone *et al.*, 2006).

Las especies *A. niger* y *A. tubingensis* son indistinguibles morfológicamente, por lo que el sistema desarrollado será muy útil para su identificación, debido a su rapidez y sencillez. Aunque inicialmente se consideró que la especie *A. tubingensis* no presentaba la capacidad de producir OTA (Accensi *et al.*, 2001), nuevas evidencias han confirmado que ambas especies son potencialmente productoras de esta micotoxina (Medina *et al.*, 2005; Perrone *et al.*, 2006). Además, la capacidad de diferenciarlas ofrece la posibilidad de conocer si ambas especies presentan alguna característica ecológica distinta, como diferentes preferencias de hospedador, de condiciones climatológicas etc.

Al inicio de esta tesis, aún no habían sido descritas las nuevas especies de la sección *Nigri* y *Circumdati* que se conocen en la actualidad, y el diseño de los cebadores se basó en una de las clasificaciones y filogenias más aceptada por los taxónomos en aquel momento (Samson *et al.*, 1994; Pitt *et al.*, 2000).

Posteriormente, hemos comprobado la especificidad de nuestros cebadores en otras especies de *Aspergillus* que han adquirido importancia en las secciones mencionadas, como *A. steynii* y *A. elegans* en la sección *Circumdati*, y *A. ibericus* y *A. vadensis* en la sección *Nigri*. Otras especies, principalmente *A. westerdijkiae* (*Circumdati*) y *A. aculeatus* (*Nigri*), no podrían ser distinguidas únicamente mediante éste ensayo, y sería necesaria la complementación mediante otros métodos, por ejemplo la secuenciación del gen de la  $\beta$ -tubulina (Frisvad *et al.*, 2004a).

Los ensayos de PCR descritos en este trabajo representan una gran ventaja en términos de rapidez de análisis y especificidad, en comparación con métodos convencionales de identificación, y los demás métodos bioquímicos y/o marcadores moleculares descritos hasta el momento para *Aspergillus*. Además, debido al carácter multicopia de la región ITS, los ensayos de PCR también mostraron una gran sensibilidad. En los casos analizados (*A. ochraceus* y *A. carbonarius*), el límite de detección ( $\approx 32$  pg) se situó en el mismo orden de magnitud que el estimado para *Fusarium* mediante amplificación de la región IGS (Bluhm *et al.*, 2002; Jurado *et al.*, 2005), mucho mayor que el obtenido en los ensayos publicados hasta ahora basados en genes de copia única, en los que se ha estimado entre 0,1-1 ng de DNA molde por reacción, también para el género *Fusarium* (Bluhm *et al.*, 2002).

Aunque existen ensayos de PCR para la detección de las especies *A. carbonarius* (Perrone *et al.*, 2004), *A. japonicus* (Perrone *et al.*, 2004), *A. niger* (Kanbe *et al.*, 2002) y *A. ochraceus* (Dao *et al.*, 2005), todos están basados en genes de copia única. Los ensayos propuestos son, por tanto, los primeros que emplean una secuencia multicopia para aumentar la sensibilidad de la detección. También existen otros métodos, como los ensayos de RAPDs para *A. carbonarius* y *A. niger* (Fungaro *et al.*, 2004; Sartori *et al.*, 2006), y los AFLPs para *A. carbonarius* y *A. ochraceus* (Schmidt *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004), aunque son mucho más laboriosos.

Podemos concluir que la especificidad y el alto grado de sensibilidad de los ensayos de PCR llevados a cabo para *A. ochraceus*, y especies de *Aspergillus* incluidas en la sección *Nigri*, proporcionan una buena herramienta para la detección temprana de los hongos productores de OTA, y distinción de los no productores, permitiendo utilizar estrategias de prevención para impedir su entrada en la cadena alimentaria.



### 1.2. ENSAYO DE PCR ESPECÍFICO PARA *Aspergillus flavus*

Se ha diseñado un ensayo de PCR para el diagnóstico de *A. flavus*, principal contaminante de cereales y productor de aflatoxinas incluido en la sección *Flavi*, donde también se incluyen otras especies productoras y no productoras de aflatoxinas y otras toxinas (*A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *A. sojae* y *A. oryzae*). Para el desarrollo del protocolo de detección específico, se ha seguido una estrategia similar a la descrita anteriormente, utilizando la misma región diana (ITS) para la elección de cebadores. Como en el caso anterior, la comparación de secuencias de cepas de *Aspergillus* reveló la existencia de poca variabilidad intraespecífica y una clara distinción de especies a nivel interespecífico.

La especificidad de los cebadores se evaluó, así mismo, en un amplio número de aislamientos de *Aspergillus* de procedencias diversas, y en otros hongos normalmente asociados con uvas y cereales, como los géneros *Penicillium* y *Cladosporium* (ver Tabla 3.3 de "Resultados"). El ensayo de PCR amplificaba una banda específica para *A. flavus* (ver Figura 3.9 de "Resultados"), mientras que no se producía amplificación en ninguna cepa de *A. parasiticus*, especie estrechamente relacionada con *A. flavus*.

Se han publicado ensayos basados en PCR para la detección de hongos aflatoxígenos, la mayoría utilizando cebadores basados en genes de biosíntesis de aflatoxinas (Geisen, 1996; Shapira *et al.*, 1996; Zachová *et al.*, 2003). Sin embargo, ninguno es capaz de discriminar entre *A. parasiticus* y *A. flavus*, e incluso las bandas de amplificación obtenidas en todos los casos son mucho más intensas para *A. parasiticus* que para *A. flavus*. Esto puede ser debido a la elevada similitud de los genes de biosíntesis de aflatoxinas en estas dos especies (Yu *et al.*, 1995; Scherm *et al.*, 2005). Existe un ensayo para la detección específica de *A. flavus* y otras especies de *Aspergillus* patógenas que emplea DNA ribosómico como diana (Sugita *et al.*, 2004), aunque nuevamente la señal de amplificación obtenida es escasa. Otras aproximaciones abordadas hasta el momento, más laboriosas, incluyen técnicas de PCR-RFLPs de ITS para la distinción entre *A. flavus* y *A. parasiticus* (Somashekar *et al.*, 2004), que son difícilmente aplicables para el análisis de numerosas muestras o a su realización en un tiempo limitado.

La distinción entre *A. flavus* y *A. parasiticus* es importante porque poseen diferentes perfiles de producción de metabolitos secundarios. *A. flavus* produce aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, versicolorina y esterigmatocisina, mientras que *A. parasiticus* no se ha descrito hasta el momento como productor de ácido ciclopiazónico o esterigmatocisina (Wilson *et al.*, 2002). Además, desde hace años se ha descrito que *A. flavus* es la especie más comúnmente implicada en la contaminación por aflatoxinas en precosecha en cultivos agroalimentarios (Cotty *et al.*, 1994), y, así, resultó ser la especie mayoritaria entre las especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* en numerosos estudios de incidencia y producción de micotoxinas en diferentes sustratos (Horn y Dörner, 1999; Trucksessy *et al.* 2002; Vaamonde *et al.* 2003; Bankole *et al.* 2004; Melki Ben Fredj *et al.* 2007; El Khoury *et al.*, 2008).

El protocolo desarrollado, sin embargo, no permite la distinción entre *A. flavus* y *A. oryzae*. La reciente secuenciación genómica (Machida *et al.*, 2005) está indicando su gran similitud de secuencias nucleotídicas, por lo que se ha sugerido que *A. oryzae* podría ser un ecotipo "domesticado" de *A. flavus* (Rokas *et al.*, 2007). Sin embargo, *A. oryzae* no es un hongo aflatoxígeno ambiental, y por lo tanto no estaría presente en los nichos donde puede encontrarse *A. flavus*.

Este nuevo ensayo permitiría, en combinación con los disponibles de copia única basados en genes de biosíntesis de aflatoxinas, disponer de buenas herramientas para un diagnóstico preciso de las principales especies de riesgo en productos agroalimentarios.

## **2. ANÁLISIS DE AISLAMIENTOS DE *Aspergillus* EN UVAS DE VINO DE LAS COMUNIDADES DE CASTILLA-LEÓN Y LA RIOJA**

La uva es una fruta que puede comercializarse fresca (uvas de mesa), seca (uvas pasas), en productos como el vino o el mosto. La producción de uvas en Europa está estimada en 306 millones de toneladas por año, lo que supone un 54% de la producción mundial. Los rendimientos anuales en uvas de mesa y uvas pasas son de 2,2 y 0,5 millones de toneladas respectivamente, mientras que se producen 190 millones de hl de vino (el 74% de la producción mundial) (Battilani *et al.*, 2003a; Battilani *et al.*, 2006b).

Además, la uva y sus derivados juegan un papel muy importante en intercambios de importación-exportación (Dutruc-Rosset, 1998). Entre los países europeos, Francia, Italia y España son, además de los principales productores de vino, sus principales exportadores (Mateo *et al.*, 2007).

En este estudio, se ha analizado la pertenencia de diferentes aislamientos de uvas de vino de las Comunidades de Castilla-León y La Rioja, a las principales especies productoras de OTA del género *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius* y agregado *A. niger*). Los resultados revelaron la presencia de especies del agregado *A. niger* en gran medida, mientras que apenas se detectó presencia de *A. ochraceus*, y hubo una ausencia total de aislamientos de *A. carbonarius* (ver Figura 3.10 de "Resultados").

Estos datos no concordaban con lo esperado en un primer momento, ya que, desde la identificación de *A. carbonarius* y *A. niger* como productores de OTA en uvas de vino (Comisión Codex Alimentarius, 1999), se había propuesto, en base a los resultados obtenidos en numerosos estudios, que *A. carbonarius* es el principal hongo presente en uvas de vino (Cabañes *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2006a; Perrone *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2006b; Leong *et al.*, 2007). Dichos estudios se realizaron, sobre todo, en zonas de climas mediterráneos subtropicales de las costas portuguesa (Serra *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2006b), española (Medina *et al.*, 2005) e italiana (Battilani *et al.*, 2003b; Battilani *et al.*, 2006a; Perrone *et al.*, 2006).

Sin embargo, en nuestro caso, las localidades muestreadas de Castilla y León y La Rioja, se encuentran en un área climática diferente, la mediterránea templada. En esta zona el clima mediterráneo queda alterado por rasgos de tipo continental debido a la altitud de estas tierras y a las montañas que dificultan la influencia marítima. Las temperaturas son extremas, con fríos inviernos y veranos breves. Las precipitaciones en general son escasas, aunque en las montañas periféricas pueden aumentar.

Serra *et al.*, 2003, encontraron mayores niveles de producción de OTA por aislamientos del agregado *A. niger* en zonas de Portugal de clima similar al estudiado, situadas más al norte, en regiones interiores y de clima más frío (mediterráneo templado). En zonas de clima mediterráneo subtropical, situadas en la parte sur de Portugal, y de clima más cálido y seco, predominó *A. carbonarius*. Así mismo, Da Rocha Rosa *et al.*, en 2002, encontraron mayor porcentaje de cepas *A. niger* productoras de OTA en uvas de Argentina y Brasil en climas más fríos y húmedos. Nuevamente, en el año 2005, Valero

*et al.* encontraron mayores niveles de aislamientos del agregado *A. niger* productores de OTA en clima mediterráneo con influencias continentales. En 2006(a), Bellí *et al.* analizaron diferentes muestras de uvas de La Rioja, Cataluña y Valencia, no encontrando a su vez aislamientos de *A. carbonarius* en uvas procedentes de La Rioja, y sí de *A. niger*. En cambio, en las dos comunidades costeras, *A. carbonarius* fue la especie mayoritaria. En el mismo año 2006, El Khoury *et al.* también describieron una mayor incidencia de especies del agregado *A. niger* en zonas interiores del Líbano. Estos datos sí que se corresponden con los resultados obtenidos en las zonas mencionadas de Castilla-León y la Rioja, en las que no se ha observado presencia de aislamientos de *A. carbonarius*, y sí de aislamientos del agregado *A. niger*, que resultaron ser mayoritarios en esta zona.

Respecto a la producción de OTA, en nuestro estudio se detectó un total de 42% de cepas con capacidad ocratoxígena, la mayoría productoras de la toxina en pocas cantidades (ver Figura 3.11 de "Resultados"). Los estudios de producción de OTA realizados por otros autores con aislamientos de uvas de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, indican resultados muy variables. En unos casos, el porcentaje de cepas potencialmente productoras de OTA encontrado fue de un 40%, similar al obtenido en nuestro caso, en uvas de vino de Brasil y Argentina (Magnoli *et al.*, 2003; Chulze *et al.*, 2006). En otras ocasiones los niveles fueron más elevados, alcanzando el 93% de aislamientos productores en Francia (Sage *et al.*, 2002), o, por el contrario, inferiores, en rangos de 16,6% y 24%, nuevamente en uvas de Brasil y Argentina (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002; Ponsone *et al.*, 2007), 14% en aislamientos de Portugal (Serra *et al.*, 2003) y 4,66% en España (Bellí *et al.*, 2004b). Serra *et al.* (2006b) analizaron aislamientos de *Aspergillus* de uvas en diferentes estadios de maduración, encontrando un 14% de aislamientos productores de OTA, de los cuales el 96% fueron aislados de uvas en la última etapa de maduración, correspondiente a la época de recolección.

A pesar de que, en nuestro caso, no se observó asociación de la producción de OTA con una variedad de uva determinada, los estudios realizados con productos procesados como vinos y mostos sí que describen ciertas diferencias en la contaminación según el tipo de uva. Así, Otteneder y Majerus en 2000 detectan entre un 25 y un 54% de contaminación con OTA en vinos, correspondiendo los mayores niveles de contaminación a vinos tintos y los menores niveles a vinos blancos. Burdaspal y Legarda, en 1999, detectan entre el 65,2 y el 90,6% de contaminación con

OTA en vinos y mostos, siguiendo la pauta anterior de contaminación dependiendo de la variedad de uva.

El Khoury *et al.* (2006) detectaron que un 57,4% de los mostos y un 60% de los vinos, de variedades de uvas tintas, estaban contaminados, y Lasram *et al.*, en 2007, detectaron hasta un 75% de mostos contaminados con OTA, obtenidos por prensado de uvas tintas, recolectadas en la última etapa de maduración. Las diferencias de contaminación observadas entre uvas de distintas variedades pueden ser debidas, por una parte, a que los vinos tintos precisan de una mayor maduración en barrica, y por tanto son más susceptibles de contaminación que los blancos (Otteneder y Majerus, 2000). Además, en los vinos tintos la fermentación se realiza por maceración con los hollejos o pieles, que es donde se encuentra la contaminación superficial por hongos, mientras que en los blancos la fermentación se realiza, en mayor medida, con el mosto obtenido por el escurrido y un ligero prensado (Plasencia y Villalón, 2005).

Resulta interesante destacar que otros productos derivados, como las uvas pasas, también arrojan porcentajes importantes de hongos productores de OTA. Abarca *et al.*, 2003 detectaron un 96,7% de aislamientos de *A. carbonarius* productores de OTA, mientras que Valero *et al.* (2005) detectaron un 45,1%. En ambos estudios también se detectó presencia de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, fundamentalmente del agregado *A. niger*, aunque la capacidad ocratóxigena de los aislamientos de estas especies fue, como suele suceder, mucho menor. Ambos grupos de investigación describen una mayor presencia de *Aspergillus* de la sección *Nigri* en pasas, en comparación con *Aspergillus* de otras secciones y especies de otros géneros, debido a que sus negras esporas les podrían proporcionar mayor resistencia al proceso de elaboración de la pasa, el cual implica una fuerte exposición a la luz solar o UV directa y elevadas temperaturas (Valero *et al.*, 2007).

Además de las condiciones meteorológicas de la zona o de la variedad de uva, la incidencia y niveles de OTA pueden verse influenciados por otros factores, como las variaciones climáticas anuales, las condiciones y prácticas de cultivo, y los sistemas de producción y almacenamiento utilizados por cada productor (Burdaspal y Legarda, 1999), y por ello es importante el análisis precosecha. Debido al descubrimiento de la presencia de OTA en vinos y su importancia en la dieta, la información acerca de la epidemiología de los hongos productores de esta toxina en uvas ha ido aumentando en

los últimos años (Blesa *et al.*, 2006). Sin embargo, en España existen pocos estudios al respecto, especialmente de uvas de vino de las zonas más interiores.

Este estudio proporciona información adicional para determinar la distribución de especies productoras de OTA, el porcentaje de cepas ocratoxígenas, y su importancia en diversas áreas geográficas.

### **3. DETECCIÓN DE CEPAS DE *Aspergillus* EN CEBADA Y TRIGO BLANDO DE CASTILLA-LEÓN Y CASTILLA-LA MANCHA**

Los cereales y sus derivados juegan un papel clave en la alimentación humana por su elevada contribución a la dieta básica. La producción española de trigo blando, cereal con mayor presencia en la dieta en España, fue de 4.900.000 TM en el año 2007. La producción de cebada en España, en el mismo año, fue de 11.100.000 TM, y en este caso se destina principalmente a alimentación animal y a la producción de cerveza. Castilla-León contribuye en un 37% a la producción nacional de trigo blando y en un 34% a la producción de cebada, mientras que Castilla-La Mancha lo hace en un 14% para trigo blando y en un 28% para cebada (Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA, 2007).

En España existen algunos estudios que han demostrado la presencia de OTA y aflatoxinas en cereales y alimentos derivados (Legarda y Burdaspal, 2001; Araguas *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2004), lo que sugiere la existencia de contaminación con alguna de las especies toxígenas descritas en las materias primas. Sin embargo, apenas hay estudios en los que se determine el momento en el que se produce esa contaminación. Por ello, en este estudio se analizó la presencia de especies de *Aspergillus* potencialmente productoras de OTA (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, agregado *A. niger* y *A. japonicus*) y aflatoxinas (*A. flavus*) en trigo blando y cebada procedentes de Castilla-León y Castilla La-Mancha, tanto en semilla de precosecha como tras su secado y almacenamiento.

El procesamiento descrito es adecuado para la detección de especies productoras de micotoxinas en cereales, y supone un gran ahorro de tiempo, ya que permite manejar un gran número de muestras a la vez, y evita los cambios de flora fúngica que se producen al almacenar las muestras antes de analizarlas.

A pesar del escaso número de muestras disponibles, especialmente de semilla seca, los resultados obtenidos apuntan a una gran diferencia de contaminación de muestras de cereal fresco, en las que no es demasiado elevada (26%), con respecto a las de cereal seco, en las que aumenta (81%) (ver Figura 3.12 de "Resultados"). Estos datos se corresponden con lo esperado, ya que la contaminación con hongos del género *Aspergillus* es, principalmente, un problema de post-cosecha y almacenamiento del cereal (Comisión Europea, 2003). Los estudios existentes sobre contaminación de cereales en diversas fases (precosecha, secado, almacenamiento y producto procesado) también muestran una mayor contaminación y presencia de OTA y aflatoxinas en los últimos estadios (Ozay *et al.*, 2008; Riba *et al.*, 2008).

La especie que destacó por su mayor presencia en las muestras analizadas fue *A. flavus*, alcanzando hasta un 81% en muestras secas de trigo. Esto concuerda con diversos estudios realizados sobre contaminación fúngica en cebada y/o trigo de consumo humano y productos procesados como harinas (Baliukoniene *et al.*, 2003; Accensi *et al.*, 2004; Cabañas *et al.*, 2008; Riba *et al.*, 2008), y otros cereales, como la cebada de malta o el maíz (Medina *et al.*, 2006; Magnoli *et al.*, 2006; Magnoli *et al.*, 2007), en los que *A. flavus* fue, dentro del género *Aspergillus*, la especie dominante. Aunque la población de *A. flavus* muestra una inusual diversidad en su capacidad de producir aflatoxinas y el porcentaje de cepas no toxígenas puede ser alto (Ehrlich, 2008), la presencia de esta especie en cereales indica un potencial riesgo de aflatoxinas, especialmente si éstos son almacenados de forma indebida. Por otra parte, la detección de *A. flavus* en campo, tanto en trigo blando como en cebada, sugiere que éste sería el origen de la contaminación en la semilla seca.

En cuanto a especies productoras de OTA, el grupo de especies detectado con más importancia en muestras secas fue el agregado *A. niger*. Esto se corresponde con lo obtenido en numerosos estudios, en los que la incidencia del agregado *A. niger* fue mayor que la de otras especies ocratoxígenas en diversas partes del mundo y en estudios realizados tanto en trigo como en cebada (Baliukoniene *et al.*, 2003; Accensi *et al.*, 2004; Hajjaji *et al.*, 2006; Cabañas *et al.*, 2008; Riba *et al.*, 2008), y otros cereales como maíz (Magnoli *et al.*, 2006; Magnoli *et al.*, 2007) o arroz (Park *et al.*, 2005).

La otra especie productora de OTA presente, tanto en cereal fresco como en seco, fue *A. carbonarius*, de la que, en cambio, solo hemos hallado un estudio donde la describa como contaminante en trigo de la costa mediterránea de Argelia (Riba *et al.*, 2008), aunque en una zona de clima diferente al estudiado en nuestro caso. Esto es importante, ya que indicaría la introducción de esta especie, típicamente asociada a uvas, en cultivos donde hasta ahora no había aparecido. Además, como en el caso de *A. flavus*, su presencia, aunque en menor proporción, en trigo blando y cebada de precosecha, sugiere un posible origen en campo de la contaminación detectada posteriormente en el cereal seco.

Destaca la ausencia de *A. ochraceus*, importante especie productora de OTA y que se ha descrito como contaminante en trigo y cebada de diversos países, incluido España (Accensi *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006; Cabañas *et al.*, 2008), aunque algunos autores apuntan que su presencia suele ser más bien ocasional, en comparación con otras especies productoras de esta micotoxina (Magan y Aldred, 2007).

Con respecto a la comparación de los niveles de contaminación fúngica en ambos años 2006 y 2007, se detectó una mayor presencia en general de especies de *Aspergillus* durante el año 2007. El invierno y principio de la primavera del año 2006 (previos a la recogida del cereal) tuvieron un carácter térmico frío en la mayor parte de España, esto es, temperatura media por debajo del mínimo del periodo 1971-2000, o Periodo de Referencia (PR). En cambio, el mismo periodo del año 2007 tuvo en conjunto un carácter cálido o muy cálido con relación al PR. En cuanto a las precipitaciones, el año 2006 tuvo en su conjunto un carácter normal desde el punto de vista pluviométrico, mientras que las precipitaciones del año 2007 estuvieron, para el conjunto del país, por debajo de la media del PR (Fuente: Agencia Estatal de Meteorología, AEMET).

Estos datos climáticos, especialmente con respecto a la temperatura, podrían explicar la aparición de contaminación por *A. carbonarius* en el año 2007 (ver Tabla 3.5 de "Resultados"), cuyo comienzo fue más cálido de lo normal para esa época del año, propicio para el crecimiento de esta especie, como se apunta en la discusión del apartado anterior, en la que señalábamos que *A. carbonarius* presenta una incidencia mayor en zonas de climas más cálidas y secas. Así mismo, también explicaría la mayor incidencia de *A. flavus*, cuyo crecimiento se ha descrito correlacionado negativamente con la pluviosidad, pero positivamente con la temperatura (Choudhary y Sinha, 1993).



Además, fluctuaciones del clima a lo largo de los años también pueden favorecer la contaminación con hongos productores de aflatoxinas (Cotty y Jaime-García, 2007).

Por último, es importante la observación de que las muestras de trigo presentaron niveles de contaminación ligeramente superiores a los de la cebada. Por tanto, podría considerarse que el consumo de trigo procedente de las regiones analizadas representaría un riesgo potencial mayor que el consumo de cebada.

El método de procesamiento y análisis descrito ha demostrado ser una estrategia rápida y eficaz para evaluar la presencia de hongos toxígenos en cereales, y podría ser utilizado en estudios epidemiológicos para predecir un riesgo potencial de micotoxinas. La presencia de las especies *A. flavus* y *A. carbonarius* en muestras de trigo blando y cebada de precosecha apunta un posible origen en campo de la contaminación detectada en post cosecha.

#### **4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *A. carbonarius* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL**

Además de la detección de la presencia del hongo productor mediante los métodos descritos, es importante su cuantificación para estimar el grado de contaminación fúngica. En los últimos años, la detección y cuantificación fiable y precisa de *A. carbonarius* en uvas y vino está adquiriendo una considerable importancia. Por ello, hemos desarrollado dos sistemas de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de esta especie. Los sistemas fueron evaluados en una matriz alimentaria frecuentemente contaminada con OTA, y ambos métodos de detección, SYBR Green I y TaqMan, fueron evaluados y comparados.

A pesar de la existencia en la literatura de algunos ensayos de PCR a tiempo real desarrollados recientemente para la detección y cuantificación de *A. carbonarius* en uvas (Mulè *et al.*, 2006; Atoui *et al.*, 2007a; Selma *et al.*, 2008), todos se basan en genes de copia única. Los ensayos que hemos descrito en nuestro caso se basan, como los anteriores, en la misma secuencia multicopia, el espaciador ITS del rDNA, concretamente en un fragmento de la región ITS2. Esto es importante porque, como ya se ha comentado, una vez que las condiciones de PCR han sido optimizadas, la sensibilidad del ensayo depende del número de copias del DNA diana. Por ello, los

ensayos de PCR basados en DNA ribosómico pueden llegar a ser 100 veces más sensibles que los basados en genes de copia única (Edwards *et al.*, 2002). En nuestro caso, se detectó un mínimo de 0,6 equivalentes genómicos, más bajo que el mínimo descrito por otros autores (Mulè *et al.*, 2006; Selma *et al.*, 2008).

Como en los ensayos de PCR convencional descritos previamente, la especificidad de los cebadores también se comprobó en este caso en una amplia muestra de cepas y especies de *Aspergillus*, así como en otros hongos frecuentemente asociados a uvas, cereales o café (*Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*) (ver Tabla 3.6 de "Resultados"). Los métodos propuestos relacionan la señal obtenida con los fluoróforos SYBR Green I y TaqMan a una cantidad de DNA medida espectrofotométricamente, mediante las curvas estándar obtenidas para *A. carbonarius*. Ambas curvas mostraron una elevada linealidad ( $R^2 > 0,99$ ), y las eficiencias obtenidas usando las pendientes de las curvas fueron 94% y 95%, lo que indica que se trata de un ensayo robusto y reproducible. Las eficiencias de reacción óptimas para un ensayo de PCR a tiempo real deben estar comprendidas entre el 90% y 105%. Eficiencias por debajo del 90% pueden ser debidas a un mal diseño de cebadores o a condiciones de reacción subóptimas. En cambio, eficiencias mayores que el 100% pueden indicar errores de pipeteo o coamplificación de productos no específicos, como la formación de dímeros de cebadores (Dorak, 2006, Boletín BioRad #5306). Sin embargo, debido a que la PCR a tiempo real aún es una técnica en desarrollo, ambas situaciones son errores frecuentemente descritos en algunos de los trabajos existentes de PCR a tiempo real para *Aspergillus* (Atoui *et al.*, 2007a, Goebes *et al.*, 2007, Jungebloud *et al.*, 2007; Selma *et al.*, 2008).

Debido a que los hongos se encuentran en los alimentos frecuentemente como esporas de origen asexual, se comprobó la eficacia de los protocolos de PCR propuestos mediante la contaminación artificial de uvas. Mediante ambos ensayos con SYBR Green I y TaqMan se detectó un mínimo de  $10^6$  esporas sin necesidad de incubación (0,4 pg de DNA por g de uva) (ver Figura 3.15 de "Resultados"). De acuerdo con los experimentos existentes de correlación de contenido de DNA y presencia de OTA descritos por otros autores (Mulè *et al.*, 2006; Atoui *et al.*, 2007a), el valor umbral mínimo de detección obtenido se correspondería con un riesgo muy bajo de presencia de OTA en uvas.

La aplicación de los dos métodos de PCR a tiempo real propuestos en DNA genómico y en muestras naturales dio como resultado dos ensayos igualmente fiables y sensibles. Tanto el número de equivalentes genómicos detectados como el límite de detección de DNA en los ensayos de contaminación artificial de uvas fueron similares mediante la utilización de SYBR Green I y sonda TaqMan, no existiendo apenas diferencias de sensibilidad entre ellos (ver Tabla 3.7 y Figura 3.15 de "Resultados"). En un amplio estudio, Andersen *et al.* (2006), compararon la utilización de SYBR Green I, sondas TaqMan TAMRA, sondas TaqMan MGB y sondas "Beacon" para la detección de soja modificada genéticamente obteniendo, también en sus ensayos, que ninguna de las aproximaciones fue significativamente más sensible que el resto. Sin embargo, apenas existen estudios que comparen, basándose en la misma secuencia diana, las distintas metodologías posibles para PCR cuantitativa. En nuestro caso, y a la vista de los resultados obtenidos con ambos métodos de detección SYBR Green y TaqMan, podríamos recomendar el uso de SYBR Green I para análisis rutinarios de cuantificación, debido a que es más económico y fácil de utilizar.

Como conclusión, los métodos de PCR a tiempo real descritos en este trabajo proporcionan un sistema preciso de detección y cuantificación de *A. carbonarius* en alimentos frecuentemente contaminados con OTA, como uvas, mostos o vino. Ambos ensayos pueden utilizarse tanto en investigación, como en la industria alimentaria con el objetivo de eliminar aquellos lotes o partidas de materias primas que supongan un mayor riesgo de contaminación con OTA.

## **5. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE OCRATOXINA A EN *A. ochraceus* Y *A. carbonarius***

### **5.1. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *aocrp450* MEDIANTE PASEO CROMOSÓMICO**

Hasta el momento, el control genético de la ruta de biosíntesis de OTA en *Aspergillus* es desconocido y solamente se ha identificado en la especie *A. ochraceus* un gen codificador de una enzima poliquétido sintasa (PKS), implicado con seguridad en dicha ruta (O'Callaghan *et al.*, 2003). En ese mismo trabajo, se clonaron y secuenciaron mediante hibridación sustractiva (SSH-PCR) 152 secuencias parciales de genes cuya

expresión aumentaba en condiciones de producción de OTA. Dos de ellas, pertenecientes a la superfamilia de citocromos P450, mostraron altos niveles de similitud con genes citocromo P450 fúngicos implicados en rutas de biosíntesis de otras micotoxinas. En 2006, O'Callaghan *et al.* analizaron la transcripción de ambos genes *p450* en condiciones de producción y no producción de OTA y la compararon con la del gen *pks*, observando una correlación positiva. En particular, la expresión de uno de ellos, llamado *p450-B03* por los autores, fue muy similar a la del gen *pks*, indicando su posible presencia en el *cluster* de biosíntesis de OTA. En este trabajo, hemos aplicado la técnica del paseo cromosómico para obtener de manera rápida y sencilla tanto la secuencia completa de ese gen *p450-B03* como las flanqueantes en dirección 5' y 3', y comprobar si podría tratarse de una organización tipo *cluster* en *A. ochraceus*.

Existen diversos métodos basados en técnicas de PCR para amplificar una región desconocida a partir de un fragmento conocido de DNA genómico. Los métodos pertenecen a tres tipos: PCR inversa, PCR con cebadores al azar y PCR con adaptadores ligados. El método empleado en nuestro caso fue el último. Desde sus primeras descripciones en 1990 (Rosenthal y Jones, 1990; Riley *et al.*, 1990), la técnica ha experimentado mejoras que permitían clonar cada vez más distancia de forma más simple y eficaz (Jones y Winistorfer, 1993; Domínguez y López-Larrea, 1994; Siebert *et al.*, 1995; Kilstrup y Kristiansen, 2000). Actualmente y con los kits comerciales disponibles, es posible obtener hasta 5 kb por cada extremo de la secuencia conocida. Por ello, el uso de esta técnica ha ido en aumento y ya se ha utilizado para la obtención de genes de síntesis de fumonisinas en *F. verticillioides* (Seo *et al.*, 2001).

En nuestro caso, en la primera ronda se logró clonar 1,6 kb por el extremo 3' y 1,9 kb por el 5', obteniendo el gen completo *aocrp450*. Con la segunda ronda, la aparición por el extremo 3' del gen codificador de una proteína NRPS y, más hacia el extremo 3', el ya mencionado gen *pks*, implicado en la síntesis de OTA (O'Callaghan *et al.*, 2003), quedó claro que nos hallábamos ante el *cluster* de producción de OTA de la especie *A. ochraceus*.

La similitud de los tres genes obtenidos con otros del GenBank puso en evidencia la existencia de tres genes adyacentes muy similares (E=0,0) en el genoma de la especie *A. niger* (ver Figura 3.17 de "Resultados"), indicando la posible organización de *cluster*

en este género. Esta información podría servir, entre otras cosas, para obtener nuevas herramientas de identificación de cepas de *A. niger* productoras de OTA.

El análisis del gen *aocrp450* puso de manifiesto que poseía una longitud de 1771 pb, con una región codificadora de 1545 pb interrumpida por cuatro intrones (ver Figura 3.18 de "Resultados"). La secuencia codificadora y sus intrones se corresponden con las descritas para hongos filamentosos (Gurr *et al.*, 1987; Unkles, 1992). El producto deducido del gen corresponde a una proteína englobada en la superfamilia de citocromos P450. En general, la similitud en la secuencia de aminoácidos entre las diferentes proteínas P450 es relativamente baja, llegando a ser menor del 20% en algunos casos (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000), por lo que las similitudes obtenidas en nuestro caso con P450 de especies de *Aspergillus* y *Fusarium* del GenBank, con valores entre el 24% ( $E=1e-33$ ) y el 64% ( $E=0,0$ ), podrían considerarse bastante elevadas.

El extremo C-terminal de la molécula, que corresponde a la región del grupo hemo, presenta una conservación de aminoácidos entre los distintos P450 mayor que la región N-terminal. El menor grado de conservación corresponde a las secuencias intermedias (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Sin embargo, al alinear la secuencia de aminoácidos de la proteína AOCRP450 con otros citocromos P450 de hongos se puede observar que, en nuestro caso, éstas muestran una considerable similitud entre ellas (ver Figura 3.20 de "Resultados"). Esta similitud en la secuencia no está limitada al dominio C-terminal del grupo hemo, aunque es donde se observa de manera más acusada, sino que la secuencia se encuentra conservada prácticamente en toda su longitud, a excepción de un corto fragmento, situado aproximadamente entre los aminoácidos 280-300. Esto puede ser debido a que todas las proteínas alineadas pertenezcan, dentro de la superfamilia de P450s, a la misma o similar familia, debido a que en el alineamiento se han incluido proteínas implicadas en funciones semejantes, como las proteínas CYP4 y TRI4, pertenecientes al *cluster* de producción de aflatoxinas y tricotecenos, respectivamente (Yu *et al.*, 2004a; Yu *et al.*, 2004b; Ward *et al.*, 2002).

A pesar del poco grado de conservación que presentan normalmente las secuencias de aminoácidos de los citocromos P450, los estudios de cristalización de proteínas han permitido comprobar que sí existe una elevada conservación en su topografía y estructura tridimensional (Graham y Peterson, 1999).

De forma general, la molécula del enzima está constituida por una combinación de regiones  $\alpha$ -hélice fundamentalmente en la región de la proteína que rodea al grupo hemo, mientras que las regiones más variables son las que constituyen los lugares de reconocimiento de sustratos (Gotoh, 1992).

La alta conservación de la región de unión hemo, como ya se ha indicado, se corresponde con el centro catalítico del enzima, y refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones y de activación de oxígeno (Williams *et al.*, 2000). En nuestro caso, la secuencia proteica reveló las estructuras secundarias típicas de P450 ( $\alpha$ -hélices I, J, K y L), y los motivos conservados típicos (unión hemo, grupo E-X-X-R y transferencia de protones) (ver Figura 3.20 de "Resultados"), también reflejados por otros investigadores para citocromos P450 implicados en la síntesis de toxinas (Hohn *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 2001; Erlich *et al.*, 2004). Además, el motivo de unión a membrana en la región N-terminal indica su probable pertenencia a P450 de clase II, cuya función en hongos incluye la síntesis de esteroides de membrana y micotoxinas (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

## 5.2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN HOMÓLOGO DEL CITOCROMO *aocrp450* MEDIANTE CEBADORES DEGENERADOS

Para intentar obtener, en *A. carbonarius*, el gen homólogo del ya secuenciado *aocrp450*, se recurrió a la técnica de PCR empleando cebadores degenerados (Telenius *et al.*, 1992). Éste método ya había sido empleado previamente con éxito para la clonación y caracterización de genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas (Song *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2005), y para la obtención de citocromos P450 en otras especies de *Aspergillus* (Van Der Brink *et al.*, 1995; Mellado *et al.*, 2001).

En esta técnica, el éxito de las reacciones de PCR depende en gran medida de la buena elección de las regiones de hibridación contra las que se dirigen los cebadores, y de otras características como la temperatura de hibridación y el contenido y naturaleza de los nucleótidos que los componen. Además, si las regiones en las que se diseñan los cebadores se encuentran muy lejanas, la eficiencia de la PCR disminuye y la amplificación se dificulta (Kwok *et al.*, 1994).

En nuestro caso, aunque se probaron diferentes combinaciones de cebadores a diferentes temperaturas, sólo los que amplificaban el fragmento de menor tamaño proporcionaron una banda de PCR que contenía la secuencia deseada.

Los cebadores con los que se logró amplificar el gen *acarp450* se diseñaron en base dos regiones conservadas, pero no en los motivos invariables, ya que esto último podría, en mayor medida, dar lugar a la amplificación de citocromos P450 con otras funciones no relacionadas con la síntesis de micotoxinas. Por otra parte, el pequeño tamaño del amplicón esperado, como ya se ha comentado, facilita la amplificación.

El fragmento amplificado del gen *acarp450* presentaba una longitud de 270 pb, con una región codificadora de 208 pb interrumpida por un intrón (ver Figura 3.23 de "Resultados"). La secuencia codificadora y su intrón se corresponden con las descritas para hongos filamentosos (Gurr *et al.*, 1987; Unkles, 1992). El producto proteico deducido del gen mostró una elevada similitud a fragmentos de proteínas englobadas en la superfamilia de citocromos P450 del GenBank, llegando a tener hasta un 87% de similitud ( $E=2e-26$ ) con una proteína P450 de *A. niger* (XP\_001396344). Aunque se desconoce la función de esa proteína (Pel *et al.*, 2007), los autores describen su gran similitud con la monooxigenasa del citocromo P450 TRI4 de la ruta de síntesis de tricotecenos de *F. sporotrichioides*. La secuencia proteica reveló una de las estructuras secundarias típicas de P450, la  $\alpha$ -hélice K, así como la presencia del motivo E-X-X-R (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000) (ver Figura 3.25 de "Resultados").

A pesar de los intentos de obtención de su secuencia completa, no se ha podido obtener aún ningún fragmento adicional del gen. La aplicación de la técnica de paseo cromosómico en *A. carbonarius* podría ser una buena estrategia alternativa.

Ante estos resultados, podemos concluir que la secuencia obtenida mediante cebadores degenerados, aunque de pequeño tamaño, presenta suficiente similitud con genes implicados en la síntesis de otras micotoxinas. Por tanto, es una buena candidata para los estudios de expresión y producción de OTA llevados a cabo, así como para la obtención de su secuencia completa en un futuro con el objetivo de poder determinar su posible implicación en el *cluster* de producción de OTA en la especie *A. carbonarius*.

## 6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *acarp450* Y *AcKS9* DE *A. carbonarius* MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL

### 6.1. PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR *A. carbonarius*

Un factor esencial para evaluar la relación entre la expresión de un gen y la producción de toxina por una especie de hongo es disponer de medios óptimos de producción y no producción de toxina para esa especie en concreto, o bien cepas productoras y no productoras de toxina. A diferencia de otras especies de *Aspergillus*, como *A. ochraceus* o especies del agregado *A. niger*, en el caso de *A. carbonarius* apenas se han descrito cepas no toxígenas en la literatura (Cabañes *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2004; Sage *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2007; El Khoury *et al.*, 2008; Visconti *et al.*, 2008), y los medios permisivo y restrictivo (especialmente el restrictivo), aún no estaban bien definidos. Los pocos datos de ausencia total de producción de OTA en un medio sintético eran debidos a la falta de crecimiento del hongo por diversos factores, como los tiempos de incubación muy cortos o los pH extremos (Esteban *et al.*, 2005), mientras que la producción de OTA se observaba, en mayor o menor medida, en un rango muy amplio de condiciones de crecimiento (Esteban *et al.*, 2005).

Para la realización de ambos medios de cultivo permisivo y restrictivo se tuvieron en cuenta, en especial, tres factores fundamentales. En primer lugar, que los estudios realizados por otros autores apuntaban al medio CYA como mayor inductor de la síntesis de OTA por *A. carbonarius*, comparado con el medio YES u otros medios (Esteban *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2006; Atoui *et al.*, 2007b). En segundo lugar, que los resultados de producción de OTA obtenidos en *A. carbonarius* a pHs extremos fueron, en general, menores, especialmente para pHs elevados (Esteban *et al.*, 2005). Por último, se ha descrito en numerosos artículos, siendo ya un hecho aceptado, que la temperatura óptima de producción de OTA por la especie *A. carbonarius* es entre 15 y 20°C, mientras que presenta su mínimo alrededor de 25 y 30°C (Esteban *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006; Valero *et al.*, 2006b), aunque para la tasa de crecimiento del hongo ocurra lo contrario (Bellí *et al.*, 2004a; Leong *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2006c; Leong *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007).



Teniendo en cuenta todos estos aspectos, y tras ensayos preliminares de producción de OTA en éstos y otros medios, elegimos como medio de producción el medio CYA a un pH moderado (6) y a una temperatura de incubación de 20°C, y como medio restrictivo el medio YES a un pH elevado (8,3), y a una temperatura de incubación de 28°C, y nos dispusimos a elaborar la curva de producción de OTA con diferentes cepas de *A. carbonarius*.

Cuando analizamos la cinética de producción de OTA en los diferentes aislamientos, observamos que existían diferencias en la cantidad que producían, en el momento en que se empezaban a detectar a niveles importantes en el medio, y en el descenso o no de su producción en función del tiempo de incubación (ver Figura 3.26 de "Resultados"). Los valores medios de producción fueron muy elevados en las cepas 168 y 173 y más bajos en la cepa 325. Esto concuerda con experimentos previos realizados por otros autores en CYA y otros medios, los cuales describen cepas de *A. carbonarius* diferentes con niveles de producción de OTA muy variables bajo las mismas condiciones, en ocasiones con diferencias de hasta 100 veces dependiendo de la cepa empleada (Bellí *et al.*, 2004c; Esteban *et al.*, 2004; Esteban *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006).

En cultivos sólidos con medio nutritivo sintético (SNM), y bajo similares condiciones de pH y temperatura de incubación, los valores de producción de OTA obtenidos en nuestro caso (ver Figura 3.26 de "Resultados") son similares o superiores a los detectados por algunos autores en cultivos sólidos. Como ejemplos de la primera situación, Bellí *et al.* (2005) detectan valores de OTA entre 2-10 µg/g al cabo de 7 días de incubación, y Leong *et al.* (2006) detectan entre 1-20 µg/g tras 15 días de incubación. Los valores más bajos de producción de OTA, más frecuentes en la literatura, corresponden a Bellí *et al.* (2004c), cuyo rango se situó entre 1-3 µg/g al cabo de 10 días, Mitchell *et al.*, 2004 detectan menos de 1 µg/g tras 10 días de incubación, Bellí *et al.* (2006c) detectaron hasta 6 µg/g, en las cepas de *A. carbonarius* más productoras, y tras 5 días de incubación, y por último, Valero *et al.* (2006b) y Valero *et al.* (2008), hallaron valores de hasta 3 µg/g de medio o colonia, al cabo de 10 y 7 días, respectivamente.

Por tanto, podemos considerar que el medio CYA y las condiciones de cultivo descritas son eficaces para la producción de OTA. Por otra parte, la ausencia de producción de

OTA en el medio restrictivo, en todas las cepas analizadas durante un periodo de 21 días, también lo avalan para su utilización como control en los experimentos de expresión. La existencia de un medio de inhibición total de la producción de OTA en diferentes cepas de *A. carbonarius* no estaba, hasta el momento, documentada.

En cuanto a la evolución de la acumulación de OTA en el medio, en las cepas 168 y 173 el aumento de OTA con el tiempo fue bastante gradual, alcanzando un máximo a los 13 días y manteniéndose (en la cepa 168) o disminuyendo muy ligeramente (cepa 173), durante los 21 días de incubación (ver Figura 3.26 de "Resultados"). Aunque no es un hecho demasiado frecuente, existen autores que describen cinéticas similares (Varga *et al.*, 2002; Esteban *et al.*, 2005).

En la cepa 325 se observó un aumento exponencial al inicio, alcanzando un máximo a los 7 días de incubación, a partir del cual comienza a disminuir. Bellí *et al.* (2004c) observaron un comportamiento similar a éste último en la cinética de producción de OTA de dos aislamientos de *A. carbonarius*, con un máximo a los 5 días y comenzando a descender a partir de ese punto. En 2006(a), Valero *et al.* describieron que, a nivel general, la máxima acumulación de OTA se detecta entre los días 4 y 7, pero esto depende de las condiciones de cultivo y del potencial ocratoxígeno de la cepa. La disminución en la acumulación de OTA tras alcanzar su valor máximo, como se observa en la cepa 325, también fue descrita en los trabajos mencionados y en otros, siendo un hecho bastante frecuente (Varga *et al.*, 2002; Bellí *et al.*, 2004c; Esteban *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2006a). Los autores coinciden en señalarlo como el resultado de dos factores: una disminución o parada en la producción de OTA, junto con la degradación de la toxina por parte del hongo para utilizarla como una fuente de carbono alternativo al agotarse la disponibilidad de nutrientes. En este aspecto, estudios previos en *A. carbonarius* han demostrado su capacidad de degradar OTA en otros productos, como la ocratoxina  $\alpha$  (Abrunhosa *et al.*, 2002), posiblemente mediante enzimas carboxipeptidasas (Deberghes *et al.*, 1995; Abrunhosa *et al.*, 2002). Así mismo, Varga *et al.* (2000c) estudiaron este fenómeno con hongos pertenecientes a la sección *Nigri*, los cuales degradaron OTA en ocratoxina  $\alpha$  en aproximadamente 7 días. Sin embargo, es importante señalar que los procesos de degradación pueden ser debidos a las cantidades limitadas de nutrientes y espacio en los medios sintéticos al cabo de cierto tiempo, y esto probablemente no ocurra en los sustratos naturales de los hongos (Bellí *et al.*, 2004c).

### 6.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *acarp450* Y *AckS9* Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN *A. carbonarius*

En este trabajo hemos valorado la expresión relativa del gen del citocromo P450 *acarp450*, así como del de una poliquétido sintasa, *AckS9*, con relación a la producción de OTA, para determinar la posible participación de éstos en la ruta de biosíntesis de OTA en *A. carbonarius*.

La metodología utilizada ha sido la de RT-PCR a tiempo real, la cual ofrece una serie de ventajas, como son una elevada sensibilidad, y que no requiere la manipulación de las muestras una vez finalizada la reacción de PCR (Heid *et al.*, 1996). Por otra parte, es un método más rápido y menos laborioso que las técnicas de hibridación utilizadas clásicamente para determinar la expresión génica, ya que no implica la realización de electroforesis ni la utilización de radiactividad. Además, la utilización de genes constitutivos como control interno de los niveles de transcripción, permite obtener valores de expresión relativos comparables entre muestras distintas. El protocolo que hemos utilizado, con el reactivo SYBR<sup>®</sup> Green y sin necesidad de diseñar sondas adicionales (como en los ensayos TaqMan), fue lo suficientemente sensible y preciso, y puede ser utilizado para cuantificar un número elevado de muestras en un tiempo relativamente corto.

En general, los resultados de expresión de ambos genes *acarp450* y *AckS9* sugieren una posible participación de las correspondientes proteínas en la síntesis de OTA en *A. carbonarius*, ya que se obtiene una mayor amplificación en los cultivos realizados con medio inductor de síntesis de OTA, con valores relativos más altos en los cultivos de las cepas 325 y 168, donde los valores de producción de OTA también fueron mayores (ver Tabla 3.10 y Figura 3.27 de "Resultados"). En las dos cepas que produjeron menos cantidad de OTA (173 y MUM 04.01), se observaron valores de expresión de los genes inferiores. Los altos niveles de correlación obtenidos entre la expresión de ambos genes y la producción de OTA confirman estos resultados.

El gen del citocromo ACARP450 presentó en general una mayor inducción de la transcripción que el de la proteína AckS9 en condiciones de producción de OTA. En todos los casos, los resultados de expresión de ambos genes en condiciones

restrictivas de producción se encontraron en el mismo rango, y sus valores mostraron diferencias estadísticamente no significativas.

El único trabajo existente hasta el momento de correlación entre expresión de genes implicados en la síntesis de OTA y producción de toxina es el realizado por O'Callaghan *et al.* en 2006. En él, los genes *pks* y *p450* se expresaron en correlación con la síntesis de OTA en *A. ochraceus*, con valores relativos de expresión más elevados, si bien los valores de producción de OTA en esta especie también fueron mucho mayores. Varga *et al.*, en 2002, observaron los diferentes rangos de producción de OTA por parte de hongos ocratoxígenos, estableciendo dos grupos: grandes productores de OTA, entre los que se encontraban, entre otros, *A. ochraceus* y *P. verrucosum*, y pequeños productores de OTA, entre los que se incluían las especies de la sección *Nigri*. Estas diferencias de producción también podrían verse reflejadas en los valores de expresión de sus genes implicados.

En varias de las rutas biosintéticas de otras micotoxinas, se ha demostrado la correlación entre la expresión de todos o determinados genes del *cluster* y la producción de la correspondiente toxina, indicando que la regulación de la producción está determinada, principalmente, a nivel de transcripción en dichos genes. Así, Doohan *et al.* (1999) describieron la correlación entre la síntesis de DON y la expresión del gen *tri5* en varios miembros del género *Fusarium* mediante RT-PCR. Sus datos de cuantificación de inducción de la expresión también resultaron mucho más elevados que en nuestro caso, aunque los niveles de producción de DON fueron, así mismo, muy elevados.

Las expresiones de los genes *fum6*, *fum7*, *fum8* y *fum9*, medidas mediante análisis de *Northern Blot*, demostraron estar correlacionadas, a su vez, con la síntesis de fumonisina B<sub>1</sub> (Seo *et al.*, 2001). Recientemente, López-Errasquín *et al.* (2007), emplearon la misma técnica de RT-PCR a tiempo real que la descrita en este trabajo para la cuantificación de la expresión de los genes *fum1* y *fum19* en *F. verticillioides*, y su comparación con los niveles de fumonisinas en el medio. Los resultados de expresión y producción de toxina obtenidos fueron, nuevamente, mayores en ambos casos.

En el caso de la síntesis de aflatoxinas, se han realizado varios estudios de expresión mediante RT-PCR dirigida a diversos genes implicados en el *cluster* de biosíntesis,

incluyendo en todos los casos monooxigenasas del citocromo P450 (Sweeney *et al.*, 2000; Scherm *et al.*, 2005; Degola *et al.*, 2007). Los trabajos describen la relación positiva entre expresión génica y producción de aflatoxinas, pero en ningún caso cuantificaron la expresión de dichos genes. Young *et al.* (2001), a su vez, emplearon la misma técnica de detección de la expresión de genes de síntesis de paxilina en *Penicillium paxilli*.

Además del conocimiento de la regulación de la biosíntesis de OTA, la metodología empleada permite una buena aproximación experimental al estudio de los factores bióticos o abióticos implicados en la producción de OTA, y posibles mecanismos de control sobre su síntesis, así como a la detección, en muestras naturales, de cepas metabólicamente activas en la producción de la toxina, ya que la detección genómica no implica necesariamente la existencia de cepas viables en la matriz. En algunos casos, ya se han descrito estudios de detección de especies de *Fusarium* y *Aspergillus*, mediante la expresión de genes de producción de tricotecenos y aflatoxinas, respectivamente, en muestras de trigo (Doohan *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 2003). También se ha desarrollado un método de cuantificación de la expresión del gen de la poliquétido sintasa implicada en la producción de OTA en *P. nordicum*, en muestras de trigo contaminadas artificialmente (Geisen *et al.*, 2004).

Por tanto, el ensayo de RT-PCR a tiempo real descrito en este trabajo ofrece, de forma rápida y sencilla, una estimación de la posible implicación de los genes *acarp450* y *AckS9* en la biosíntesis de OTA en *A. carbonarius*. Además, dada la correlación positiva existente entre los valores de OTA detectados en el medio y la expresión de los genes, constituye una posible alternativa para evaluar el potencial toxígeno de una determinada cepa de *A. carbonarius*. Adicionalmente, el método pudiera ser adaptado en un futuro para su uso en materias primas o alimentos procesados.

## **7. EFECTO DE DOS FUNGICIDAS EN LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *acarp450* Y *AckS9* EN *A. carbonarius***

Durante los últimos años, el interés por la disminución en las cantidades de fungicidas sintéticos aplicados a los cultivos de cereales, vid y otras materias primas ha ido en aumento. Esto, por una parte, es debido a riesgos ambientales, que incluyen efectos

tóxicos y bioacumulativos en microorganismos ambientales, flora y fauna (Montesinos, 2003; Karpouzas y Singh, 2006; Römbke *et al.*, 2007), y a la contaminación del medio acuático (Massoud *et al.*, 2008). Por otra parte, existe un gran número de estudios científicos acerca de la posible toxicidad y riesgos oncogénicos de numerosos fungicidas en humanos. Concretamente, el mancozeb, fungicida objeto de este estudio y ampliamente utilizado en la industria agrícola, ha demostrado poseer efectos neurotóxicos y carcinógenos en animales (Tsang y Trombetta, 2007). Las progresivas investigaciones en estos aspectos han conducido a la adopción, por parte de numerosas autoridades sanitarias, de normativas sobre la utilización de fungicidas cada vez más restrictivas (Boon *et al.*, 2004). Sin embargo, ciertos estudios han demostrado que el uso de estos compuestos en bajas dosis podría suponer un aumento de hongos toxígenos tolerantes y, en algunos casos, de sus micotoxinas asociadas (Arroyo *et al.*, 2005; Ellner, 2005). En otros estudios también se comprobó el efecto de determinados fungicidas en la expresión de los genes de producción de toxina, observando un efecto inductor con su adición (Doohan *et al.*, 1999).

En el caso del género *Aspergillus*, aún no existen muchos estudios al respecto. Por esta razón, nos pareció interesante analizar, de forma independiente, los efectos de los tratamientos con antifúngicos sobre ambos aspectos, mediante la determinación, por una parte, del crecimiento y la producción de OTA por *A. carbonarius* en un sistema *in vitro* en presencia de fungicidas comúnmente utilizados para cultivos, y, por otra, del efecto de dichos fungicidas en la expresión de los genes *acarp450* y *AckS9*.

Los fungicidas utilizados fueron elegidos por su amplio espectro de acción, que incluye, entre otros, al género *Aspergillus*, y por su uso extendido en cultivos de vid, de los que suele ser contaminante *A. carbonarius*. El mancozeb es un fungicida del grupo de los ditiocarbamatos de acción multi-sitio, cuyo efecto es la interrupción del ciclo de Krebs y actividad respiratoria en varias de sus etapas (Domico *et al.*, 2006). El benomilo pertenece al grupo de los bencimidazoles y su mecanismo de acción es la inhibición de la mitosis, mediante la unión a la  $\beta$ -tubulina, y el bloqueo de su polimerización en microtúbulos (Georgopapadakou, 1998; Hochwagen *et al.*, 2005).

En cuanto al fungicida cola de caballo, se trata de un extracto obtenido a base de *Equisetum arvense*. Esta planta medicinal contiene alta concentración de sales de sílice y un compuesto saponósido, en teoría sustancias tóxicas para los hongos. Su uso, sin

embargo, se tuvo que descartar por problemas de contaminación proveniente del propio *stock* de fungicida. Únicamente hemos hallado un artículo donde se refiere el uso de compuestos naturales contra la producción de micotoxinas, aunque no incluyen el compuesto utilizado en nuestro caso. En este trabajo, Krishnamurthy y Shashikala (2006) tratan semillas de soja con diferentes extractos naturales de especies como *Withania somnifera*, *Eucalyptus citriodora*, *Hyptis suaveolens* o *Citrus medica*. Los autores observan en todos los casos una disminución de los valores de aflatoxina B1 con el tratamiento, pero no estudian el crecimiento de los hongos *in vitro*.

El efecto del mancozeb sobre el crecimiento en *A. carbonarius* ha sido estudiado previamente por Bellí *et al.* (2006b), que observaron que la dosis mínima para inhibir totalmente el crecimiento *in vitro* durante 30 días era de 750 µg/ml, mucho mayor que la obtenida en nuestro caso para incubaciones de 5 días (25 µg/ml) (ver Figura 3.29 de "Resultados").

El efecto del benomilo, en cambio, aún no ha sido comprobado específicamente para *A. carbonarius*. Summerbell (1993) realizó un estudio de inhibición en numerosos hongos, incluidas otras especies de *Aspergillus*, en las que halló que las concentraciones de benomilo necesarias para disminuir el crecimiento, aproximadamente al 50%, fueron entre 2 y 10 µg/ml, lo cual concuerda con lo obtenido en nuestro caso (7 µg/ml). Yan *et al.* (1993), describieron que, en cepas de *F. verticillioides*, la sensibilidad mínima a benomilo era de 1,5 µg/ml, resultado que, aproximadamente, concuerda con lo obtenido en nuestro caso para *A. carbonarius* (ver Figura 3.29 de "Resultados").

La carbendazima, fungicida bencimidazol del mismo grupo que el benomilo, sí ha sido empleada en experimentos *in vitro* para *A. carbonarius*. En el mismo trabajo que el anterior, Bellí *et al.* (2006b), observaron que la dosis mínima de carbendazima para inhibir totalmente el crecimiento durante 30 días era de 150 µg/ml. Este valor, nuevamente, es muy superior al descrito en este trabajo, pero en nuestro caso para cultivos de 5 días (15 µg/ml). Medina *et al.*, en 2007, describieron que el uso de 450 ng/ml de carbendazima no suponía, como tampoco en nuestro caso, una inhibición del crecimiento en *A. carbonarius* en las mismas condiciones que nuestro experimento, aunque al modificar otras condiciones, como la actividad de agua y la temperatura de incubación, su efecto sí fue patente.

En general, y para los experimentos realizados en nuestras mismas condiciones, el efecto de ambos fungicidas sobre el crecimiento de *A. carbonarius* fue similar al descrito por otros autores en otros hongos.

La producción de OTA se vio notablemente reducida en los dos casos con la adición de una concentración de fungicida que disminuía el crecimiento al 50%, especialmente mediante el uso de mancozeb. En cambio, a bajas concentraciones de fungicida se produjo un aumento de la producción de OTA (ver Tabla 3.12 y Figura 3.30 de "Resultados"). El aumento de producción de OTA con la aplicación de dosis reducidas de fungicida se ha observado en diferentes hongos, como *P. verrucosum* (Arroyo *et al.*, 2005) y *A. carbonarius* (Bellí *et al.*, 2006b). Concretamente, Bellí *et al.* (2006b) también describen un aumento en la producción de OTA en *A. carbonarius* por parte del mancozeb a bajas concentraciones.

Con el objetivo de comprobar si el efecto sobre la producción de OTA se mantenía en el tiempo, se realizaron mediciones de OTA al cabo de 7 días en las mismas condiciones. A altas dosis de ambos fungicidas, los resultados en el día 7 indicaron un ligero aumento de producción comparado con el día 5, acompañado a su vez por un lento aumento del crecimiento, por lo cual podríamos deducir que, en el caso de dosis elevadas, la reducción en la producción a los 5 días pudiera ser debida a la disminución del crecimiento del hongo. Con la aplicación de dosis bajas de fungicida, el efecto observado a los 5 días de mayor producción de OTA en comparación con el control, o bien se invierte, o bien las producciones del control y de las muestras con fungicida se equiparan (ver Tabla 3.12 y Figura 3.30 de "Resultados"). Por lo tanto, el resultado de aumento de producción de OTA con bajas dosis de fungicida se observa solamente a los 5 días del cultivo.

Para el análisis de la expresión de los genes *acarp450* y *AckS9*, la metodología elegida ha sido, nuevamente, la RT-PCR a tiempo real. La expresión del gen *acarp450* se vio, en general, ligeramente reducida al cabo de 5 días de incubación con la adición de ambos fungicidas, excepto en el caso del benomilo a la concentración más baja, en la que permaneció prácticamente al mismo nivel. Esto no se correlaciona con los resultados de producción de OTA a los mismos días de incubación (ver Tablas 3.12 y 3.13 de "Resultados"). Como ya se ha comentado, a bajas concentraciones de fungicida la producción de OTA fue mayor, por lo pudiera pensarse que la expresión



debería verse aumentada. Al contrario ocurre para las altas concentraciones de fungicida, en las que la baja producción de OTA puede parecer, en principio, que disminuirá la expresión.

Sin embargo, los valores de producción de OTA obtenidos a los 7 días (Tabla 3.12 de "Resultados") indican que la micotoxina sigue sintetizándose y, por lo tanto, los genes implicados en su síntesis siguen activos, y ésta podría ser la causa de la poca variación de la expresión encontrada ya que, en general, la síntesis del mRNA precede a la síntesis de la propia toxina. Así, Schmidt-Heydt *et al.* (2007) establecen la cinética de expresión del gen *otapksPV*, implicado en la síntesis de OTA en *P. verrucosum*, durante 9 días, encontrando variaciones en la expresión de aumento y disminución, que en ocasiones tampoco se correspondían exactamente con la cantidad de OTA producida. La explicación que ofrecen los autores es que las medidas de concentración de OTA son valores, en general, acumulativos, mientras que los datos de expresión son el resultado de la situación de los genes en el punto exacto de la toma de muestra, y, al tener el mRNA un tiempo de vida media corto, su concentración puede cambiar rápidamente.

En cuanto al gen *AckS9*, el efecto fue el contrario con la adición del mancozeb, aumentando su expresión a ambas concentraciones de fungicida, e independientemente de los valores de producción de OTA que se alcanzasen hasta ese momento. La adición del benomilo prácticamente no modificó, a ninguna concentración, la expresión génica. Doohan *et al.* (1999), también describieron el aumento de la expresión del gen de la poliquétido sintasa *tri5*, con la aplicación de dos fungicidas. Schmidt-Heydt *et al.* (2007), por su parte, describen el aumento de expresión del gen *otapksPV* en presencia de otros factores de estrés, como conservantes (propionato cálcico y sorbato potásico) y estrés osmótico o hídrico. El estrés hídrico también causó un aumento en la expresión del gen *fum1* en *F. verticillioides* (Jurado *et al.*, 2008). Recientemente, estos resultados han sido confirmados en un amplio estudio de la expresión de OTA mediante microarrays (*P. verrucosum*/*P. nordicum*), tricotecenos (*F. culmorum*) y aflatoxinas (*A. parasiticus*) bajo estrés hídrico, de pH y temperatura. En los tres casos hubo activación de la expresión, con un comportamiento similar para todas las toxinas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2008).

En general, la explicación que los autores ofrecen para estos fenómenos es que la aplicación de ligeras condiciones de estrés conduce a una activación secundaria de los genes de biosíntesis de micotoxinas, como mecanismo de defensa. Esto, además, podría tratarse de un fenómeno generalizado para otros factores, debido a que se ha observado el mismo comportamiento para variaciones de pH y temperatura (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008), lo que podría indicar, desde un punto de vista de seguridad alimentaria, que se deben evitar condiciones que impongan un estrés, intermedio o bajo, a las especies micotoxígenas durante el transporte o almacenamiento de los alimentos o materias primas.

Los resultados obtenidos para la expresión génica indican, en conjunto, que la activación de la transcripción génica de estos genes se produce a casi cualquier concentración de OTA, y sólo se observa muy disminuida cuando la producción de OTA es totalmente nula y, además, se mantiene en el tiempo. Sin embargo, se requerirían estudios adicionales, más extensos, para obtener alguna conclusión firme sobre el comportamiento de expresión génica y producción de OTA.



# CONCLUSIONES

---



1. Se han desarrollado protocolos específicos para la identificación mediante PCR de las especies *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. ochraceus* y *A. flavus* basados en la región ITS. Los ensayos han demostrado ser rápidos, sensibles y específicos, y proporcionan una buena herramienta para la valoración del riesgo potencial de contaminación de alimentos y materias primas con toxinas sintetizadas por especies del género *Aspergillus*.
2. La aplicación de los ensayos de PCR específicos en uvas de las Comunidades de Castilla-León y La Rioja ha permitido detectar la presencia de aislamientos del agregado *A. niger*, pero no de *A. carbonarius* ni de *A. ochraceus*, posiblemente debido a las características climáticas de la zona.
3. El protocolo de detección de especies productoras de micotoxinas en trigo blando y cebada de Castilla-León y Castilla-La Mancha reveló la presencia de la especie *A. flavus*, *Aspergillus* del agregado *A. niger* y *A. carbonarius*, lo que indica un posible riesgo de contaminación con aflatoxinas y OTA en cereales de esa región. La presencia en precosecha de *A. flavus* y *A. carbonarius* sugiere que el origen de la contaminación detectada en postcosecha procede del propio cultivo.
4. Se han desarrollado dos ensayos para la detección y cuantificación de *A. carbonarius* mediante PCR a tiempo real, mediante el empleo de SYBR Green I y TaqMan, respectivamente. Con ambos protocolos se obtuvieron resultados igualmente fiables y sensibles en DNA genómico y en uvas contaminadas, aunque se podría sugerir la utilización de SYBR Green I en análisis rutinarios debido a su bajo coste y facilidad de empleo.

5. Se ha ampliado, utilizando la técnica de paseo cromosómico, la secuencia del gen *p450-B03*, codificador de una monooxigenasa del citocromo P450 en *A. ochraceus*, y la de otros dos genes *nrps* y *pks*, identificando así el posible *cluster* de producción de OTA en esa especie. La utilización de cebadores degenerados en la especie *A. carbonarius* ha permitido el aislamiento de una secuencia, *acarp450*, que mostró homología con proteínas monooxigenasas del citocromo P450.
6. Se han desarrollado dos métodos, basados en RT-PCR a tiempo real, para analizar la expresión relativa de los genes *acarp450* y *AckS9* en *A. carbonarius* en relación con la producción de OTA. Los resultados en ambos casos indicaron niveles de expresión que se correlacionaron positivamente con la biosíntesis de OTA.
7. Se ha analizado la expresión relativa, mediante RT-PCR a tiempo real, de los genes *acarp450* y *AckS9*, y la producción de OTA en *A. carbonarius* creciendo en presencia de los fungicidas mancozeb y benomilo a diferentes concentraciones. Las dos cepas de *A. carbonarius* analizadas mostraron un comportamiento muy similar en todos los experimentos. Los resultados sugirieron que la aplicación de bajas dosis de mancozeb o benomilo podrían suponer un aumento de los niveles de OTA sintetizada por *A. carbonarius*. Las dosis más altas no provocaron en ningún caso la inhibición en la producción de OTA. Bajo ninguna de las concentraciones de fungicida utilizadas se observó una disminución significativa de la expresión relativa de ambos genes, y sí un ligero aumento en el caso del mancozeb sobre la expresión del gen *AckS9*.

## CONCLUSIONS

---





1. PCR-based assays were developed for specific and sensitive detection of OTA producing *Aspergillus* species and other related species from section *Nigri*. Additionally, a specific PCR assay was developed for *A. flavus*. The species specific primers were designed within the ITS regions of the rDNA.
2. The specific PCR assays developed were successfully applied for detection of OTA-producing *Aspergillus* species in grapes from different varieties in Castilla-León and La Rioja. The results indicated the presence of *A. niger* aggregate species, and only one *A. ochraceus* isolate. No *A. carbonarius* isolates were detected. From the total of potential OTA-producing isolates, only a low percentage of them produced a significant amount of OTA.
3. The protocol used for detection of the *Aspergillus* toxigenic species in cereals can readily be used to enhance the efficiency and to assess the quality of raw material to be processed into food and feed products. The analysis of wheat and barley samples at pre- and post-harvest stages revealed the presence of *A. flavus*, *A. carbonarius* and *A. niger* aggregate, indicating that certain risk of OTA and aflatoxins associated to crops might exist in this region. The detection of *A. flavus* and *A. carbonarius* in low amounts in pre-harvest barley and soft wheat suggested that field contamination might be a probable source of contamination of stored grains by those species.
4. Two qPCR protocols were developed for the direct and specific detection and quantification of *A. carbonarius* to be used in grapes, using both SYBR Green I and TaqMan approaches. The efficiency and sensitivity of both methods were comparable, and only the lower cost of SYBR Green might favour its use in routine screenings. The qPCR based protocols reported in this work are a rapid and powerful tool to detect and quantify *A. carbonarius* in certain food systems frequently contaminated with OTA, such as grapes, musts and wines.

5. The full open reading frame of *p450-B03* gene, encoding a cytochrome P450 enzyme from *A. ochraceus*, was amplified using a genome walking technique. Two additional genes, encoding a NRPS and the previously described PKS involved in OTA biosynthesis, were identified in the flanking regions of *p450-B03*. A partial region of a cytochrome P450 (named *acarp450*) was amplified in *A. carbonarius* using degenerate primers based on the sequence of *p450-B03*, which could correspond to the same gene.
6. Two specific protocols for *A. carbonarius*, based on real time RT-PCR, were developed to detect and quantify the expression of the *acarp450* and *AckS9* genes, corresponding to the amplified cytochrome P450 and a PKS encoding gene. A positive correlation between OTA production and expression of both genes was observed, indicating that they may be effectively involved in OTA biosynthesis.
7. The effect of mancozeb and benomyl fungicides was tested on several *A. carbonarius* strains. Growth, OTA production and expression of the *acarp450* and *AckS9* genes were studied in two strains of *A. carbonarius* by real time RT-PCR. Both strains followed a similar pattern in all the experiments. The results using low concentrations of the fungicides indicated an increase of OTA production. High concentrations were not able to inhibit completely the OTA production. The expression of the genes was in some cases slightly reduced under the tested conditions, and was increased for the *AckS9* gene with the addition of mancozeb with the two different concentrations used.

# BIBLIOGRAFÍA

---



- Aarts, H. y Keijer, J.** (1999). Genomic fingerprinting of micro-organisms by automatic laser fluorescence analysis (ALFA) of amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3: 9- 10.
- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañes, F.J.** (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2650-2652.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J.** (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, 64 (6): 903-906.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellá, G. y Cabañes, F.J.** (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66 (3): 504-506.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. y Cabañes, F.J.** (2004). Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86: 33-49.
- Abbas, H.K.** (Ed.) (2005). Aflatoxin and Food Safety. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. Pág. 585.
- Abrunhosa, L., Serra, R. y Venâncio, A.** (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25): 7493-6.
- Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M.L. y Cabañes, F.J.** (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 191-196.
- Accensi, F., Abarca, M.L., Cano, J., Figuera, L. y Cabañes, F.J.** (2001). Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79 (3-4): 365-370.
- Accensi, F., Abarca, M.L. y Cabañes, F.J.** (2004). Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. *Food Microbiology*, 21: 623-627.
- Al-Musallam, A.A.** (1980). *Aspergillus helicothrix*, sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 46 (4): 407-411.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Andersen, C.B., Holst-Jensen, A., Berdal, K.G., Thorstensen, T. y Tengs, T.** (2006). Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26): 9658-9663.
- Araguas, C., González-Peñas, E., López de Cerain, A. y Bello, J.** (2003). Acerca de la posible contaminación por ocratoxina en alimentos. I. Cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la Comunidad Foral de Navarra. *Alimentaria*: 23-29.

- Arnheim, N., Krystal, M., Schmickel, R., Wilson, G., Ryder, O. y Zimmer, E.** (1980). Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77: 7323-7327.
- Arroyo, M., Aldred, D., y Magan, N.** (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (3): 223-231.
- Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E.L. y Wogan, G.N.** (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*, 85: 1705-1707.
- Assaf, H., Azouri, H. y Pallardy, M.** (2004). Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-xL. *Toxicological Sciences*, 79 (2): 335-44.
- Atoui, A., Dao, H.P., Mathieu, F. y Lebrihi A.** (2006). Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular nutrition & food research*, 50 (6): 488-493.
- Atoui, A., Mathieu, F. y Lebrihi, A.** (2007a). Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 313-318.
- Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F., Magan, N. y Lebrihi, A.** (2007b). Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes and wine. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (4): 961-968.
- Aukema, H.M., House, J.D., Bankovic-Calic, N. y Ogborn, M.R.** (2004). Increased renal fibrosis and expression of renal phosphatidylinositol 4-kinase-beta and phospholipase C (gamma1) proteins in piglets exposed to ochratoxin-A. *Nephron Physiology*, 96 (1): 19-25.
- Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R. y Abate, D.** (2006). Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162 (1): 57-63.
- Baker, S.E. y Bennett, J.W.** (2008). *The aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. Págs. 3-13.
- Baliukoniene, V., Bakutis, B. y Stankevicius, H.** (2003). Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10 (2): 223-227.
- Bankole, S.A., Ogunsanwo, B.M. y Mabekoje, O.O.** (2004). Natural occurrence of moulds and aflatoxin B1 in melon seeds from markets in Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (8): 1309-1314.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.A.** (1998). *Illustrated genera of imperfecti fungi*. 4ª edición. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, EEUU.

- Bartine, H. y Tantaoui-Elaraki, A.** (1997). Growth and toxigenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, 16: 61-65.
- Battilani, P., Giorni, P. y Pietri, A.** (2003a). Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 715-722.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L. Giorni, P. y Kozakiewicz, Z.** (2003b). Occurrence of Ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66 (4): 633-636.
- Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z. y Magan, N.** (2006a). Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S72-S82.
- Battilani, P., Magan, N. y Logrieco, A.** (2006b). European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S2-S4.
- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S. y Cabañes, F.J.** (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (2): 125-30.
- Bayman, P. y Baker, J.L.** (2006). Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*, 162 (3): 215-223.
- Beardall, J.M. y Miller, J.D.** (1994). Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. En: *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, EEUU. Págs. 487-539.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S.** (2003). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 72-77.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J.** (2004a). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (1): 19-27.
- Bellí, N., Pardo, E., Marín, S., Farré, G., Ramos, A.J. y Sanchis, V.** (2004b). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 541-546.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín S.** (2004c). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38 (1): 72-77.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V. y Marín, S.** (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4): 839-44.



- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J. y Bragulat, M.R.** (2006a). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S40-S45.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J.** (2006b). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants*, 23 (10): 1021-9.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. y Marín, S.** (2006c). Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiology*, 23 (7): 622-627.
- Bendele, A.M., Carlton, W.W., Krogh, P. y Lillehoj, E.B.** (1985). Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J 3 C3H)F1 mouse. *Journal of National Cancer Institute*, 75: 733-742.
- Bennett, J.W. y Papa, K.E.** (1988). The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Advances in Plant Pathology*, 6: 263-280.
- Bennet, J.W. y Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16: 497-516.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. y Wheeler, D.L.** (2002). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 30: 17-20.
- Beretta, B., De Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C. y Restani, P.** (2002). Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, 19 (1): 70-75.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. y Cleveland, T.E.** (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 83-93.
- Bleas, M.J., De Grandis, S.A. y Trevors, J.T.** (1998). Amplified fragment length polymorphisms (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21: 99-114.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C. y Mañes, J.** (2006). Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(6): 473-478.
- Bluhm, B.H., Flaherty, J.E., Cousin, M.A. y Woloshuk, C.P.** (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for the differential detection of trichotecene- and fumonisins-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*, 65: 1955-1961.
- Bogs, C., Battilani, P. y Geisen, R.** (2006). Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (1): 39-47.
- Boon, P.E., Tjoe Nij, E.I.M., Van Donkersgoed, G. y Van Klaveren, J.D.** (2004). Probabilistic intake calculations performed for the Codex Committee on Pesticide Residues. Report 2004-2005. RIKILT - Institute of Food Safety, Wageningen, Holanda.

- Botstein D., White R.L., Skolnick M. y Davis R.W.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Annual Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314-331.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S. y Morgavi, D.P.** (2007). Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90 (7): 3197-3201.
- Boudra, H., Le Bars, P. y Le Bars, J.** (1995). Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1156-1158.
- Bove, F.J.** (1970). The story of ergot. Basel. Nueva York, EEUU.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L. y Cabañes F.J.** (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 139-144.
- Bragulat, M.R., Martínez, E., Castellá, G. y Cabañes, F.J.** (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (1-2): 43-48.
- Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H. y Leonard, T.J.** (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (4): 1418-1422.
- Bullerman, L.B. y Bianchini, A.** (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 140-146.
- Burdaspal, P.A. y Legarda, T. M.** (1999). Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, 36: 107-113.
- Cabañes, R., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Cabañes FJ.** (2008). Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food Microbiology*, 25(5): 642-647.
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Mínguez, S. y Pons, A.** (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213-215.
- Canela, R., Viladrich, R., Velázquez, C.A. y Sanchis, V.** (1994). A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain. *Mycopathologia*, 125 (1): 29-32.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C. y Gooday, G.** (2001). The Fungi. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Carmichael, J.W., Brycekendrick, W. y Connors, I.L.** (1980). *The genera of Hyphomycetes*. The University of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canadá.
- Cary, J.W., Klich, M.A. y Beltz, S.B.** (2005) Characterization of aflatoxin producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97: 425-432.

- Cary, J.W. y Ehrlich, K.C.** (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162: 167–177
- Castegnaro, M., Chernozemsky, I.N., Hietanen, E. y Bartsch, H.** (1990). Are mycotoxins risk factors for endemic nephropathy and associated urothelial cancers? *Archiv für Geschwulstforschung*, 60 (4): 295-303.
- Castegnaro, M., Barek, J., Fremy, J.M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E.G. y Telling, G.M.** (1991). Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer Scientific Publications*, 113. Lyon, Francia.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. y Pfohl-Leszkowicz, A.** (2006). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50 (6): 519-529.
- Castellá, G., Larsen, T.O., Cabañes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P. y Geisen, R.** (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25 (1): 74-83.
- Castelo, M.M., Sumner, S.S. y Bullerman, L.B.** (1998). Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *Journal of Food Protection*, 61 (8): 1030-1033.
- Chelkowski, J., Szabotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B., Radomyrska, W. y Wiewiorowska, M.** (1982). Mycotoxins in cereal grain, 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung*, 26: 1-7.
- Choudhary, A.K. y Sinha, K.K.** (1993). Competition between a toxigenic *Aspergillus flavus* strain and other fungi on stored maize kernels. *Journal of Stored Products Research*, 29: 75-80.
- Chulze, S.N., Ramírez, M.L., Torres, A. y Leslie, J.F.** (2000). Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5312-5315.
- Chulze, S.N., Magnoli, C.E. y Dalcero, A.M.** (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S5-S9.
- Ciegler, A., Fennell, D.I., Sansing, G.A., Detroy, R.W. y Bennett, G.A.** (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Applied Microbiology*, 26 (3): 271-278.
- Cleveland, T.E., Dowd, P.F., Desjardins, A.E., Bhatnagar, D. y Cotty, P.J.** (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science*, 59 (6-7): 629-642.

- Comisión Codex Alimentarius** (1999). Comité del Codex sobre Contaminantes y Aditivos Alimentarios, sesión 31. La Haya, Holanda.
- Comisión Codex Alimentarius** (2002). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas, con anexos sobre la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos, CX/FAC 02/21. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Rotterdam, Holanda.
- Comisión Europea** (1997). SCOOP 3.2.2. Evaluación de la ingesta alimentaria de la población de los Estados miembros de la UE. Comisión Europea, EUR 17523. Versión revisada, Noviembre de 1997.
- Comisión Europea** (1998). Comité Científico sobre un dictamen alimentario sobre la Ocratoxina A, CS/CNTM/MYC/14 final, Anexo II al documento XXIV/2210/98, 28 de Septiembre de 1998.
- Comisión Europea** (2003). Dirección general de protección de la salud y del consumidor, opinión del comité científico de nutrición animal sobre sustancias indeseables en semillas. Págs. 6-7.
- Comisión Europea** (2006). Reglamento N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas, 19 de Diciembre de 2006.
- Cotty, P.J., Bayman, D.S., Egel, D.S. y Elias, K.S.** (1994). Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. En: The Genus *Aspergillus*. Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 1-27.
- Cotty, P.J. y Jaime-García, R.** (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 109-115.
- Curtui, V.G., Gareis, M., Usleber, E. y Märtilbauer, E.** (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Additives and Contaminants*, 18 (8): 730-138.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G. y Rosa, C.A.** (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 19 (11): 1065-1072.
- Dao, H.P., Mathieu, F. y Lebrihi, A.** (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 61-67.
- Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E. y Dalcero, A.M.** (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19 (4): 408-414.
- Deberghes, P., Betbeder, A.M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J.F., Krivobok, S., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. y Creppy, E.E.** (1995). Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 11: 37-47.

- Degola, F., Berni, E., Dall'Asta, C., Spotti, E., Marchelli, R., Ferrero, I. y Restivo, F.M.** (2007). A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (2): 409-417.
- Denning, D.W.** (2006). Aspergillosis. Schering-Plough Corporation. Disponible en la página web de *Aspergillus*: <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?library.php~main>.
- De Vries, R.P., Frisvad, J.C., van de Vondervoort, P.J., Burgers, K., Kuijpers, A.F., Samson, R.A. y Visser, J.** (2005). *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87 (3): 195-203.
- Domíco, L.M., Zeevalk, G.D., Bernard, L.P. y Cooper, K.R.** (2006). Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology*, 27 (5): 816-825.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Zlender, V., Cvjetković, B., Jurjević, Z., Topolovec-Pintarić, S. e Ivić, D.** (2005). Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (3): 427-432.
- Domínguez, O. y López-Larrea, C.** (1994). Gene walking by unpredictably primed PCR. *Nucleic Acids Research*, 22(15): 3247-3248.
- Donato, M.T. y Castell, J.V.** (2003). Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clinical Pharmacokinetics*, 42 (2): 153-178.
- Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry, D.W. y Nicholson, P.** (1999). Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3850-3854.
- Dorak, M.T.** (2006). Real-Time PCR (Advanced Methods Series). Taylor & Francis Group, Oxford, Reino Unido.
- Doster, M.A., Michailides, T.J. y Morgan, D.P.** (1996). *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from California orchards. *Plant Disease*, 80: 484-489.
- Du, L., Zhu, X., Gerber, R., Huffman, J., Lou, L., Jorgenson, J., Yu, F., Zaleta-Rivera, K. y Wang, Q.** (2008). Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35 (6): 455-464.
- Dutruc-Rosset, G.** (1998). The state of vitiviniculture in the world and the statistical information in 1998. Office International de la Vigne et du Vin, París, Francia.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, C. y Alabouvette, C.** (1997). Evaluation of restrictive analysis of polymerase chain reaction (PCR)-Amplified Ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research*, 101: 179-187.
- Edwards, S.G., O'Callaghan, J. y Dobson, A.D.W.** (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, 106: 1005-1025.

- EFSA** (2006). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 365: 1-56.
- Ehrlich, K.C., Chang, P.K., Yu, J. y Cotty, P.J.** (2004). Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11): 6518-6524.
- Ehrlich, K.C., Yu, J. y Cotty, P.J.** (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 518-527.
- Ehrlich, K.H.** (2008). Genetic diversity in *Aspergillus flavus* and its implications for agriculture. En: *Aspergillus in the Genomic Era*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Holanda. Págs. 233-247.
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M.L. y Lebrihi, A.** (2006). Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (23): 8977-8982.
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M.L. y Lebrihi, A.** (2008). Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (6): 2244-2250.
- Ellner, F.M.** (2005). Results of long-term field studies into the effect of strobilurin containing fungicides on the production of mycotoxins in several winter wheat varieties. *Mycological Research*, 21: 112-115.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J.** (2004). Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black *aspergilli*. *Research in Microbiology*, 155(10): 861-866.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J.** (2005). Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. *Journal of Food Protection*, 68 (7): 1435-1440.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J.** (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, 23 (7): 634-640.
- Färber, P., Geisen, R. y Holzapfel, W.H.** (1997). Detection of aflatoxinogenic fungi in figs by a PCR reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 215-220.
- Feng, G.H. y Leonard, T.J.** (1995). Characterization of the polyketide synthase gene (*pksL1*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology*, 177: 6246-6254.
- Ferreira, N.P. y Pitout, M.J.** (1969). The biosynthesis of ochratoxin. *Journal of the South African Chemical Institute*, 22: S1.

- Fink-Gremmels, J.** (2005). Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in Food: Recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June–1 July 2005. *Food Additives and Contaminants*, 22 (1): 1-5.
- Fink-Gremmels, J.** (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 172-180.
- Follmann, W. y Lucas, S.** (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian *in vitro* mutagenicity test system. *Archives in Toxicology*, 77 (5): 298-304.
- Fouler, S.G., Trivedi, A.B., y Kitabatake, N.** (1994). Detoxification of citrinin and Ochratoxin A by hydrogen peroxide. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry International*, 77: 631-637.
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A.** (2000). *Neopetromyces* gen. nov and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 10: 201-207.
- Frisvad, J.C., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A. y Samson R.A.** (2004a). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50: 23-43.
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A.** (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49: 1-173.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. y Smedsgaard, J.** (2004b). *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 440–445.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P. y Samson, R.A.** (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 442-453.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., de Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F.J., Ehrlich, K. y Samson, R.A.** (2007). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, 59: 31-37.
- Fujii, I., Watanabe, A., Sankawa, U. y Ebizuka, Y.** (2001). Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemical Biology*, 8: 189-197.
- Fungaro, M.H., Vissotto, P.C., Sartori, D., Vilas-Boas, L.A., Furlaneto, M.C. y Taniwaki, M.H.** (2004). A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*, 49: 123–127.
- Galan, L.C. y Rodríguez, J.J.** (2003). La contaminación por Micotoxinas. En: Observatori de la Seguretat Alimentaria. Universitat Autònoma de Barcelona.

- Gams, W., Chistensen, M., Onion, A.H.S., Pitt, J.I. y Samson, R.A.** (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 55-64.
- Gareis, M. y Scheuer, R.** (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Lebensmittelhyg*, 51: 102-104.
- Gareis, M. y Wolff, J.** (2000). Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses*, 43 (1): 79-83.
- Geisen, R.** (1996). A multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 388-392.
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A. y Farber, P.** (2004). Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 501–507.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. y Samson, R.A.** (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59: 1-10.
- Geiser, D.M.** (2008). Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, 12: 1-6.
- Georgopapadakou, N.H.** (1998). Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 547-557.
- Ginzinger, D.G.** (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503-512.
- Goebs, M.D., Hildemann, L.M., Kujundzic, E. y Hernández, M.** (2007). Real-time PCR for detection of the *Aspergillus* genus. *Journal of Environmental Monitoring*, 9 (6): 599-609.
- Gómez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S. y Cabañes, F.J.** (2006). Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology*, 23 (6): 541-545.
- González-Jaén, M.T., Mirete, S., Patiño, B., López-Errasquín, E., y Vázquez, C.** (2004). Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium Verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (5-6): 525-532.
- González-Salgado, A.** (2004). Detección de las principales especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A mediante PCR. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.



- Gotoh, O.** (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) protein from comparative analysis of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 83-90.
- Graham, S.E. y Peterson, J.A.** (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369 (1): 24-29.
- Guarro, J., Gene, J. y Stchigel, A.M.** (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Review*, 12 (3): 454-500.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E. y Kinghorn, J.R.** (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. En: *Gene Structure in Eukariotic Microbes*. IRL Press, Oxford, Reino Unido. Págs. 93-139.
- Hajjaji, A., El Otmani, M., Bouya, D., Bouseta, A., Mathieu, F., Collin, S. y Lebrihi, A.** (2006). Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (6): 494-499.
- Halstensen, A.S., Nordby, K.C., Elen, O. y Eduard, W.** (2004). Ochratoxin A in grain dust--estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11 (2): 245-254.
- Hawksworth, D., Kirk, P., Sutton, B. y Pegler, D.** (1996). Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8ª edición. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. y Denning, D.W.** (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., y Williams, P.M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- Henry, T., Iwen, P. y Hinrichs, S.** (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4): 1510-1515.
- Hillis, D.M. y Dixon, M.T.** (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66: 411-433.
- Hjort, C.M.** (2003). Genetically Engineered Food. Wiley, Weinheim, Alemania. Págs. 86-89.
- Hochwagen, A., Wrobel, G., Cartron, M., Demougin, P., Niederhauser-Wiederkehr, C., Boselli, M.G., Primig, M. y Amon, A.** (2005). Novel response to microtubule perturbation in meiosis. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (11): 4767-4781.
- Hohn, T.M., Desjardins, A.E. y McCormick, S.P.** (1995). The *tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular & general genetics*, 248 (1): 95-102.
- Hohn, T.M., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Desjardins, A.E. y Proctor, R.H.** (1998). Function and biosynthesis of trichothecenes produced by *Fusarium* species. En:

- Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. Págs. 17-24.
- Holmberg, T., Breitholtz-Emanuelsson, A., Häggblom, P., Schwan, O. y Hult, K.** (1991). *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia*, 116 (3): 169-176.
- Horie, Y.** (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*, 36: 73-76.
- Horn, B.W. y Dorner, J.W.** (1999). Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (4): 1444-1449.
- Horn, B.W.** (2007). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10): 1088-1101.
- Huff, J.E.** (1991). Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. *IARC scientific Publications*, (115): 229-44.
- Huff, W.E. y Hamilton, P.B.** (1979). Mycotoxins - their biosynthesis in fungi: Ochratoxins - metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, 42: 815-820.
- Hult, K., Plestina, R., Habazin-Novak, V., Radic, B. y Ceovic, S.** (1982). Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Archives of Toxicology*, 51: 313-321.
- IARC** (International Agency for Research on Cancer) (1982). The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *IARC Monograph Supplement*, 4. Lyon, Francia.
- IARC** (International Agency for Research on Cancer) (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *World Health Organization*, 56. Lyon, Francia.
- ISO** (Organización Internacional para la Estandarización) (1996a). 15141-1 PNE-prEN. Productos alimenticios. Determinación de ocratoxina A. Parte 1: Método por cromatografía líquida de alta resolución para harina de trigo (ISO/DIS15141-1).
- ISO** (Organización Internacional para la Estandarización) (1996b). 15141-2 PNE-prEN. Productos alimenticios. Determinación de ocratoxina A. Parte 2: Método por cromatografía líquida de alta resolución para salvado de cebada, maíz y trigo (ISO/DIS 15141-2).
- JECFA** (2001). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 56<sup>th</sup> Meeting. Génova, Italia.
- Jeffrey, A.J., Wilson, V., y Thein, S.L.** (1985a). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 316: 67-73.
- Jeffrey, A.J., Wilson, V., y Thein, S.L.** (1985b). Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, 316: 76-79.

- Jelinek, C.F., Pohland, A.E. y Wood, G.E.** (1989). Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 72: 223-230.
- Jiménez, A.M., López de Cerain, A., González-Peñas, E. y Bello, J.** (2001). Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pâtés by high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*, 18 (6): 559-563.
- Jones, D.H. y Winistorfer, S.C.** (1993). Genome walking with 2- to 4-kb steps using panhandle PCR. *PCR Methods and Applications*, 2(3): 197-203.
- Jordan, J.A.** (2000). Real-time detection of PCR products and microbiology. *Trends Guide*, 12: 61-66.
- Jørgensen, K.** (2005). Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food - a review of EU occurrence data. *Food Additives and Contaminants*, 22 (1): 26-30.
- Juhász, A., Pfeiffer, I., Keszthelyi, A., Kucsera, J., Vágvölgyi, C. y Hamari, Z.** (2008). Comparative analysis of the complete mitochondrial genomes of *Aspergillus niger* mtDNA type 1a and *Aspergillus tubingensis* mtDNA type 2b. *FEMS Microbiology Letters*, 281 (1): 51-57.
- Jungebloud, A., Bohle, K., Göcke, Y., Cordes, C., Horn, H. y Hempel, D.C.** (2007). Quantification of product-specific gene expression in biopellets of *Aspergillus niger* with real-time PCR. *Enzyme Microbiology Techniques*, 40 (4): 653-660.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B. y González-Jaén, M.T.** (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. equiseti* and *F. sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (6): 562-568.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V. y González-Jaén M.T.** (2006). PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 681-689.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N. y González-Jaén, M.T.** (2008). Relationship between solute and matrix potential stress, temperature, growth, and *FUM1* gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (7): 2032-2036.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W. y Var, I.** (2006). Strategies to prevent micotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 593-619.
- Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T. e Itoh, K.** (2003). Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (4): 337-343.

- Kanbe, T., Yamaki, K. y Kikuchi A.** (2002). Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiology and Immunology*, 46 (12): 841-848.
- Karolewicz, A. y Geisen, R.** (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (7): 588-595.
- Karpouzas, D.G. y Singh, B.K.** (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology*, 51: 119-185.
- Kiffer, E. y Morelet M.** (1997). Les Deuteromycetes. Classification et clés d'identification générique. INRA Editions, París. Págs. 306-386.
- Kilstrup, M. y Kristiansen, K.N.** (2000). Rapid genome walking: a simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer. *Nucleic Acids Research*, 28 (11): E55.
- Klich, M.A. y Pitt, J.I.** (1998). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, Australia. Pág. 116.
- Klich, M. A., Mullaney, E. J., Daly, C. B. y Cary, J. W.** (2000). Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 605-609.
- Kozakiewicz, K.** (1989). *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers*, 161. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Kradin, R.L. y Mark, E.J.** (2008). The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 132 (4): 606-614.
- Krishnamurthy, Y.L. y Shashikala, J.** (2006). Inhibition of aflatoxin B production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Letters in Applied Microbiology*, 43 (5): 469-474.
- Kuiper-Goodman, T. y Scott, P.M.** (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2 (3): 179-248.
- Kumeda, Y. y Asao, T.** (1996). Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2947-2952.
- Kusters-Van Someren, M.A., Kester, H.M.C., Samson, R.A. y Visser, J.** (1990). En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 83-88.
- Kusters-Van Someren, M.A., Samson, R.A. y Visser, J.** (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, 19: 21-26.

- Kwok, S., Chang, S.Y., Sninsky, J.J. y Wang, A.** (1994). A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications*, 3(4): S39-47.
- Lasram, S., Bellí, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V. y Ghorbel, A.** (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (3): 376-379.
- Lattanzio, V.M., Solfrizzo, M., Powers, S. y Visconti, A.** (2007). Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (20): 3253-3261.
- Leblanc, J.C., Tard, A., Volatier, J.L. y Verger, P.** (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants*, 22 (7): 652-672.
- Legarda, T. y Burdaspal, P.** (2001). Presencia de ocratoxina A en muestras de pan comercializado en España y en muestras procedentes de doce países extranjeros. *Alimentaria*, Abril: 89-96.
- Leong, S.L., Hocking, A.D. y Pitt, J.I.** (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigr*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 83-88.
- Leong, S.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S.** (2006). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110 (3): 209-216.
- Leong, S.L., Hocking, A.D. y Scott, E.S.** (2007). *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (1): 124-133.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Kuhis, K. y Börner, T.** (1992). Characterization of filamentous fungi and yeasts by DNA fingerprinting and random amplified polymorphic DNA. *Belgian Journal of Botany*, 125: 226-233.
- Link, J.H.F.** (1809). Observaciones in *Ordines plantarum naturales*. *Gesellschaft fur Natur* (Berlín) 3, 1-42.
- Livak, K.J., Flood, S.P.A., Marmejo, J., Giusti, W. y Deetz, K.** (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4: 357-362.
- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M. y González-Jaén, M.T.** (2007). Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68 (2): 312-317.

- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. y Kikuchi, H.** (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438 (7071): 1157-1161.
- Magan, N.** (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162 (3): 245-253.
- Magan, N. y Aldred, D.** (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 131-139.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. y Dalcero, A.** (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 179-184.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C.A. y Dalcero, A.M.** (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*, 39 (4): 326-331.
- Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S. y Dalcero, A.M.** (2006). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia*, 161 (1): 53-58.
- Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Chiacchiera, S.M. y Dalcero, A.M.** (2007). Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*, 163 (5): 249-260.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. y Schnürer, J.** (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219 (1): 129-135.
- Makimura, K., Murayama, S. Y. y Yamaguchi, H.** (1994). Specific detection of *Aspergillus* and *Penicillium* species from respiratory specimens by polymerase chain reaction (PCR). *Japanese Journal of Medical Sciences and Biology*, 47: 141-156.
- Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurtz, M. Zepnik, H., Mantle, P. Volkel, W., Hard, G.C. y Dekant, W.** (2005). Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicological and Applied Pharmacology*, 206 (1): 43-53.

- Marr, J.S. y Malloy, C.D.** (1996). An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus*, 12 (1): 7-24.
- Martínez-Culebras, P.V. y Ramón, D.** (2007) An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (2): 147-153.
- Masoud, W. y Kaltoft, C.H.** (2006). The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (2): 229-234.
- Massoud, A.H., Derbalah, A.S. y Belal-el, S.B.** (2008). Microbial detoxification of metalaxyl in aquatic system. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 20 (3): 262-267.
- Mateo, R., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M.** (2004). An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: An overview on toxigenic fungi and micotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. Págs. 219-235.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M, Mateo, F. y Jiménez, M.** (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 79-83.
- Mayer, Z., Färber, P. y Geisen, R.** (2003). Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of *nor-1* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2): 1154-1158.
- McMillan, L.K., Carr, R.L., Young, C.A., Astin, J.W., Lowe, R.G., Parker, E.J., Jameson, G.B., Finch, S.C., Miles, C.O., McManus, O.B., Schmalhofer, W.A., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Goetz, M., Tkacz, J.S. y Scott, B.** (2003). Molecular analysis of two cytochrome P450 monooxygenase genes required for paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*, and effects of paxilline intermediates on mammalian maxi-K ion channels. *Molecular Genetics and Genomics*, 270 (1): 9-23.
- Medina, A., González, G., Sáez, J.M., Mateo, R. y Jiménez, M.** (2004). Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (2): 261-267.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M. y Jiménez, M.** (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4696-4702.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, F. y Jiménez, M.** (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (2): 196-203.

- Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M. y Jiménez, M.** (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (3): 230-235.
- Mégnégneau, B., Debets, F., y Hoekstra, R.F.** (1993). Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics*, 23: 323-329.
- Melin, P., Stratford, M., Plumridge, A. y Archer, D.B.** (2008). Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. *Microbiology*, 154:1251-1257.
- Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A. y Mliki, A.** (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 245-250.
- Mellado, E., Díaz-Guerra, T.M., Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J.L.** (2001). Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7): 2431-2438.
- Micheli P.A.** (1729). Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. Florencia, Italia.
- Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M.J., Soldevilla, C. y González-Jaén, M.T.** (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 213-221.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. y Magan N.** (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (2): 439-445.
- MMWR** Informe Semanal de Morbilidad y Mortalidad (Morbidity and Mortality Weekly Report) (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning-Eastern and Central provinces, Kenya, January-July, 2004. *MMWR weekly*, 53 (34): 790-793.
- Montesinos, E.** (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6 (4): 245-252.
- Mühlencoert, E. Mayer, I., Zapf, M.W., Vogel, R.F. y Niessen, L.** (2004). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 651-659.
- Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G. y Visconti, A.** (2006). Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 28-34.



- Mutire, B.N. y Ogana, G.** (2005). Aflatoxin levels in maize and maize products during the 2004 food poisoning outbreak in Eastern Province of Kenya. *East African Medical Journal*, 82: 275-279.
- Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A. y Ritieni, A.** (2007). Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (25): 10499-10504.
- National Toxicology Program** (1989). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*, 358: 1-142.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O.** (1983). *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania, EEUU. Pág. 193.
- Ness, F., Lavellee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., y Dulau, L.** (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of Sciences on Food and Agriculture*, 62: 89-94.
- Nesterov, V.S.** (1951). Etiology, pathogenesis and clinical aspects of alimentary-toxic aleukia (septic angina). *Terapevticheskiĭ Arkhiv*, 23 (1): 88-94.
- Niessen, L.** (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 38-46.
- Nikkuni, S., Nakajima, H., Hoshina, S., Ohno, M., Suzuki, C., Kashiwagi, Y. y Mori, K.** (1998). Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 44: 225-230.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C. y Samson, R.A.** (2008). Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1727-1734.
- O'Brien, E. y Dietrich, D.R.** (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35 (1): 33-60.
- O'Callaghan, J., Caddick, M.X. y Dobson, A.D.W.** (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 149: 3485-3491.
- O'Callaghan, J. y Dobson, A.D.W.** (2006). Molecular characterization of ochratoxin A biosynthesis and producing fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 227-243.
- O'Callaghan, J., Stapleton, P.C. y Dobson, A.D.W.** (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 213-221.
- Ochman, H., Gerber, A.S. y Hartl, D.L.** (1998). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120 (3): 621-623.

- Oelofse, D., Dubery, I.A., Meyer, R., Arendse, M.S., Gazendam, I. y Berger, D.K.** (2006). Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry*, 67 (3): 255-263.
- OMS (Organización Mundial de la Salud)** (1999). Basic Food Safety for Health Workers. *World Health Organization*, 99, Ginebra, Suiza. Pág. 25.
- OMS (Organización Mundial de la Salud)** (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 906. Ginebra, Suiza. Pág. 70.
- Ottener, H. y Majerus, P.** (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17 (9): 793-798.
- Ozay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S. y Yilmaz, A.** (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: a 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 209-218.
- Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L. y Mahoney, N.E.** (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164: 241-248.
- Papachristou, A. y Markaki, P.** (2004). Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*, 21 (1): 85-92.
- Papagianni, M.** (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25 (3): 244-263.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, J. y Sanchis, V.** (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention-a review. *Food Additives and Contaminants*, 23 (4): 398-410.
- Parenicová, L., Suykerbyuk, M.E.G., Samson, R.A. y Visser, J.** (1997). Evaluation of RFLP analysis for the classification of selected black *Aspergilli*. *Mycological research*, 101: 810-814.
- Parenicová, L., Skouboe, P., Samson, R.A., Rossen, L. y Jaap, V.** (2000). Molecular tools for the classification of black *Aspergilli*. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 413-424.
- Parenicová, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R., Rossen, L., Hoor-Suykerbyuk, M.T. y Visser, J.** (2001) Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 521-527.

- Pariza, M.Y. y Johnson, E.A.** (2001). Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regular Toxicology*, 33: 173-186.
- Parlamento Europeo** (2002). Regulación 178/2002 del 28 de Enero de 2002. Principios generales de la legislación alimentaria - Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria - Procedimientos de seguridad alimentaria. *Official Journal of the European Communities*, L31. Págs. 1-24.
- Park, J.W., Choi, S.Y., Hwang, H.J. y Kim, Y.B.** (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (3): 305-314.
- Passone, M.A., Resnik, S.L. y Etcheverry, M.G.** (2005). In vitro effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B accumulation by peanut *Aspergillus* section *Flavi*. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (3): 682-691.
- Patiño, B., Mirete, S., González-Jaén, M.T., Mulé, G., Rodríguez, T., Vázquez, C.** (2004). PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection*, 67 (6): 1278-1283.
- Pathy, L.** (1987). Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Letters*, 214: 1-7.
- Payne, G.P. y Brown, M.P.** (1998) Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Reviews of Phytopathology*, 36:329-362.
- Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Debets, A.J., Dekker, P., van Dijck, P.W., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S., de Groot, P.W., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P., van den Hondel, C.A., van der Heijden, R.T., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J., Meulenbergh, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N., Ram, A.F., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J., Wedler, H., Wösten, H.A., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J., Visser, J. y Stam, H.** (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25 (2): 221-231.
- Perrone, G., Susca, A., Stea, G. y Mulé, G.** (2004). PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 641-649.

- Perrone, G., Mulè, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. y Logrieco, A.** (2006). Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1): 680-685.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. y Samson, R.A.** (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59: 53-66.
- Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., Kocsubé, S., Tóth, B., Kozakiewicz, Z. y Samson, R.A.** (2008). *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1032-1039.
- Peterson, S.W.** (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 323-355.
- Peterson, S.W.** (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100 (2): 205-226.
- Petzinger, E., y Weidenbach, A.** (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, 76: 245-250.
- Pfohl-Leszkowicz, A. y Manderville, R.A.** (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (1): 61-99.
- Phillips, T.D., Afriyie-Gyawu, E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N.A., Ofori-Adjei, D., Jolly, P., Johnson, N., Taylor, J., Marroquin-Cardona, A., Xu, L., Tang, L. y Wang, J.S.** (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 134-145.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. y Samson, R.A.** (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 725-735.
- Pitt, J.I.** (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2): 266-269.
- Pitt, J.I.** (1996). What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter* 7: 1.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D.** (1997). Fungi and Food Spoilage Vol. II. Academic Press, Sydney, Australia.
- Pitt, J.I.** (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38, Suppl. 1: 17-22.
- Pitt, J.I., Samson, R.A. y Frisvad, J.C.** (2000). List of accepted species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. En: Integration of modern taxonomic

- methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 9-47.
- Pittet, A.** (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149: 479-492.
- Plasencia, P. y Villalón, T.** (2005). Manual de los vinos de España. Editorial Evergráficas, León, España. Págs. 32-33.
- Pointing, S.B. y Hyde, K.D.** (2001). Bio-exploitation of Filamentous Fungi. Fungal Diversity Press, Hong Kong. Págs. 223-251.
- Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A. y Chulze S.** (2007). Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (2): 131-135.
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Hohn, T.M.** (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 100-112.
- Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D. y Desjardins, A.E.** (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 237-249.
- Ramírez, C.** (1982). *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Holanda.
- Ramos, A.J., Labernia, N., Marín, S., Sanchís, V. y Magan, N.** (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract médium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 133-140.
- Raper, K.B., y Fennell, D.I.** (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- RASFF** (2007). Rapid Alert System for Food and Feed, Annual Report 2007. Health and Consumer Protection Directorate-General, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo.
- Rath, P.M. y Ansorg R.** (2000). Identification of medically important *Aspergillus* species by a single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR amplified intergenic spacer region. *Mycoses* 43: 381-386.
- Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F., y Hassan, A.A.** (1996). Detection of Ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by  $\gamma$ -radiation. *Applied Radiation Isotopes*, 47: 617-621
- Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. y Sabaou, N.** (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2): 85-92.
- Richard, J.L.** (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 3-10.

- Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C. y Markham, A.F.** (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Research*, 18 (10): 2887-2890.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, J., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W. y Nierman, W.C.** (2007). What can comparative genomics tell us about species concepts in genus *Aspergillus*?. *Studies in Mycology*, 59: 11-17.
- Römbke, J., Garcia, M.V. y Scheffczyk, A.** (2007). Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53 (4): 590-598.
- Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández-Pinto, V. y Vaamonde, G.** (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 115 (2): 140-143.
- Roscoe, V., Lombaert, G.A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio, J., Kitchen, D., Kotello, S., Krakalovich, T., Trelka, R. y Scott, P.M.** (2008). Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. *Food Additives and Contaminants*, 25 (3): 347-355.
- Rosenthal, A. y Jones, D.S.** (1990). Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 18 (10): 3095-3096.
- Russell, R. y Paterson, M.** (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41: 1467-1474.
- Sáez, J.M., Medina, A., Gimeno-adelantado, J.V., Mateo, R. y Jiménez, M.** (2004). Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1029: 125-133.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F. y Creppy, E.E.** (2002). Fungal flora and Ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 1306-1311.
- Sage, L., Garon, D. y Seigle-Murandi, F.** (2004). Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (18): 5764-5768.
- Sambrook, J. y Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EEUU.
- Samson, R.A.** (1992). Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. En: *Aspergillus: Biology and industrial applications*. Reed Publishing, Stoneham, Massachusetts, EEUU. Págs. 355-390.

- Samson, R.A.** (1994). Taxonomy-current concepts of *Aspergillus* systematics. En: *Aspergillus*. Plenum Press, Nueva York, EEUU. Págs. 1-22.
- Samson, R.A.** (2000). List of names of *Trichocomaceae* published between 1992 and 1999. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 73-79.
- Samson R.A., Houbroken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M. y Frisvad, J.C.** (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbroken, J., Frisvad, J.C. y Varga, J.** (2007). Diagnostic tools to identify black *aspergilli*. *Studies in Mycology*, 59: 129-145.
- Sangare-Tigori, B., Dem, A.A., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., Moukha, S. y Creppy, E.E.** (2006). Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002. *Human & Experimental Toxicology*, 25 (4): 211-216.
- Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H. y Fungaro, M.H.** (2006). PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, 157: 350-354.
- Savelkoul, P.H., Aarts, H.J., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L., Schouls, L. y Lenstra, J.A.** (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3083-3091.
- Schaad, N.W. y Frederick, R.D.** (2002). Real-Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 250-258.
- Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A. y Migheli, Q.** (2005). Detection of transcripts of the aflatoxin genes *aflD*, *aflO*, and *aflP* by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (2): 201-210.
- Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H. y Niessen, L.** (2003) Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLPs. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 138-146.
- Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F. y Niessen, L.** (2004). Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (5): 899-909.
- Schmidt-Heydt, M. y Geisen, R.** (2007). A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2): 131-140.

- Schmidt-Heydt, M., Baxter, E., Geisen, R. y Magan, N.** (2007). Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (3): 277-283.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N. y Geisen, R.** (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284 (2): 142-149.
- Schwartz, D.C. y Cantor, C.R.** (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75.
- Scott, P.M.** (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47: 489-499.
- Scott, P.M.** (1996). Effects of processing and detoxification treatments on Ochratoxin A: introduction. *Food Additives and Contaminants*, 13: 19-21.
- Seifert, K.A. y Gams, W.** (2001). The taxonomy of anamorphic fungi. En: *The Mycota. Systematics and evolution Part A*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. Págs. 307-347.
- Seifert, K.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J.** (1995). A critique of sequence analysis in the taxonomy of the filamentous ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73: S760-S767.
- Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V. y Aznar, R.** (2008). Real-Time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 126-134.
- Seo, J.A., Proctor, R.H. y Plattner, R.D.** (2001). Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 34 (3): 155-165.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. y Venancio, A.** (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 63-68.
- Serra, R., Braga, A. y Venâncio, A.** (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156 (4): 515-521.
- Serra, R., Cabañes, F.J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mulè, G. y Kozakiewicz, Z.** (2006a). *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*, 98 (2): 295-306.
- Serra, R., Mendonça, C. y Venâncio, A.** (2006b). Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl. 1: S35-S39.
- Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A. y Salomón, R.** (1996). Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3270-3273.



- Shimizu, T., Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S. y Nihira, T.** (2005). Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7): 3453-3457.
- Shwab, E.K. y Keller, N.P.** (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 112: 225-230.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. y Lukyanov, S.A.** (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 23 (6): 1087-1088.
- Skaug, M.A.** (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 16 (2): 75-78.
- Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A. y Phillips, D.H.** (1992). Manual de Enfermedades de las Plantas. Mundi-Prensa, Madrid, España. Págs. 291-318.
- Somashekar, D., Rati, E.R. y Chandrashekar, A.** (2004). PCR-restriction fragment length analysis of *affR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 101-107.
- Song, Z., Cox, R.J., Lazarus, C.M. y Simpson, T.J.** (2004). Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 5 (9): 1196-1203.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.
- Sreemannarayana, O., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Marquardt, R.R. y Abramson, D.** (1988). Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *Journal of Animal Science*, 66 (7): 1703-1711.
- Stander, M.A., Bornscheurer, U.T., Henke, E. y Steyn, P.S.** (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of Ochratoxin A. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 5736-5739.
- Staunton, J. y Weissman, K.J.** (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Products Reports*, 18 (4): 380-416.
- Stefanovic, V., Toncheva, D., Atanasova, S. y Polenakovic, M.** (2006). Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *American Journal of Nephrology*, 26 (1): 1-11.
- Steyn, P.S., Holzapfel, C.W. y Ferreira, N.P.** (1970). The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 9: 1977-1983.
- Stoev, S.D., Paskalev, M., MacDonald, S. y Mantle, P.G.** (2002). Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53 (6): 481-487.
- Støren, O., Holm, H. y Størmer, F.C.** (1982). Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (4): 785-789.

- Subramanian, C.V.** (1972). The perfect states of *Aspergillus*. *Current Science*, 41: 755-761.
- Sugita, C., Makimura, K., Uchida, K., Yamaguchi, H. y Nagai, A.** (2004). PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology*, 42: 433-437.
- Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. y Kumagai, S.** (2006). Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. *Journal of Food Protection*, 69 (6): 1365-1370.
- Summerbell, R.C.** (1993). The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (3): 572-577.
- Susca, A., Stea, G., Mulè, G. y Perrone, G.** (2007a). Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10): 1154-1160.
- Susca, A., Stea, G. y Perrone, G.** (2007b). Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10): 1148-1153.
- Sutton, D.A., Fothergill, A.W. y Rinaldi, M.G.** (1998). Guide to Clinically Significant Fungi. Williams & Wilkins. Baltimore, EEUU.
- Sweeney M.J. y Dobson A.D.W.** (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175:149-163.
- Sweeney, M.J., Pàmies, P. y Dobson, A.D.** (2000). The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. *International Journal of Food Microbiology*, 56 (1): 97-103.
- Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H. y Kushiro, M.** (2007). Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2): 59-66.
- Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A. y Tunnacliffe, A.** (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13 (3): 718-725.
- Thom, C. y Church, M.B.** (1926). The *Aspergilli*. Williams and Wilkins, Baltimore, EEUU.
- Trucksessy, M.W., Dombrink-Kurtzman, M.A., Tournasy, V.H. y White, K.D.** (2002). Occurrence of aflatoxins and fumonisins in Incaparina from Guatemala. *Food Additives and Contaminants*, 7: 671-675.
- Tsang, M.M. y Trombetta, L.D.** (2007). The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. *Toxicology and Industrial Health*, 23 (8): 459-470.

- Unkles, S.E.** (1992). Gene organization in industrial filamentous fungi. En: Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi. University Press, Cambridge, Reino Unido. Págs. 28-53.
- Urbano, G.R., Taniwaki, M.H., Leitão, M.F. y Vicentini, M.C.** (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 64 (8): 1226-1230.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández-Pinto, V., Comerio, R. y Degrossi, C.** (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1): 79-84.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V.** (2005). Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in applied microbiology*, 41(2): 196-201.
- Valero, A., Farré, J.R., Sanchis, V., Ramos, A.J. y Marín S.** (2006a). Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. *Food Microbiology*, 23 (8): 753-756.
- Valero, A., Farré, J.R., Sanchis, V., Ramos, A.J. y Marín S.** (2006b). Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and  $a_w$ . *International Journal of Food Microbiology*, 110 (2):160-164.
- Valero, A., Oliván, S., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J.** (2007). Effect of *intra* and interspecific interaction on OTA production by *A. section Nigri* in grapes during dehydration. *Food Microbiology*, 24 (3): 254-259.
- Valero, A., Begum, M., Hocking, A.D., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V.** (2008). Mycelial growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* on simulated grape medium in modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (2): 372-379.
- Vanden Bossche, H.** (1988). *Aspergillus* and Aspergillosis. Hardback, Nueva York, EEUU. Pág. 23.
- Van den Brink, H.J., van Zeijl, C.M., Brons, J.F., van den Hondel, C.A. y van Gorcom, R.F.** (1995). Cloning and characterization of the NADPH cytochrome P450 oxidoreductase gene from the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *DNA and Cell Biology*, 14 (8): 719-729.
- Van den Brink, H.M., van Gorcom, R.F., van den Hondel, C.A. y Punt, P.J.** (1998). Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 23 (1): 1-17.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D.B. y Theron, J.J.** (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205: 1112-1113.

- Van der Vossen, J.M.B.M., y Hofstra, H.** (1996). DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 35-49.
- Van Egmond, H.P. y Speijers, G.J.A.** (1994). Survey of data on the incidence of levels of ochratoxin A in food and animal feed world-wide. *Journal of Natural Toxins*, 3: 125-144.
- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C. y Jonker, M.A.** (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1): 147-157.
- Van Walbeek, W., Scott, P.M., Harwig, J. y Lawrence, J.W.** (1969). *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology*, 15 (11): 1281-1285.
- Varga, J., Kevei, E., Fekete, C., Kozakiewicz, Z. y Croft, J.H.** (1993). Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*, 97: 1207-1212.
- Varga, J., Kevei, E., Vriesma, A., Debets, F., Kozakiewicz, Z. y Croft, J.H.** (1994). Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 612-621.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. y Kozakiewicz, Z.** (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (12): 4461-4464.
- Varga, J., Kevei, E., Hamari, Z., Tóth, B., Téren, J., Croft, J.H. y Kozakiewicz, Z.** (2000a). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda. Págs. 397-411.
- Varga, J., Kevei, E., Tóth, B., Kozakiewicz, Z. y Hoekstra, R.F.** (2000b). Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 593-599.
- Varga, J., Rigó, K. y Téren, J.** (2000c). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59 (1-2): 1-7.
- Varga, J., Rigó, K., Téren, J. y Mesterházy, A.** (2001). Recent advances in ochratoxin research. *Cereal Research Communications*, 29 (1-2): 85-100.
- Varga, J., Rigó, K., Lamper, C., Téren, J. y Szabó, G.** (2002). Kinetics of ochratoxin A production in different *Aspergillus* species. *Acta Biologica Hungarica*, 53 (3): 381-388.
- Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M. y Samson, R.A.** (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biserial black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1925-1932.

- Verma, R. y Chakraborty, D.** (2008). Alterations in DNA, RNA and protein contents in liver and kidney of mice treated with ochratoxin and their amelioration by *Emblica officinalis* aqueous extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 65 (1): 3-9.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G. y Solfrizzo, M.** (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 193-202.
- Visser, J., Skuykerbuy, K.M., Kusters-Van Someren, M.A., Samson, R.A. y Schaap, P.** (1996). Classification of black *Aspergilli* by RFLP analysis. En: Fungal identification techniques. ECSC-EC-EAEC, Bruselas, Bélgica. Págs. 194-201.
- Von Arx, J.A.** (1981). The Genera of fungi sporulating in pure culture. Lubrecht & Cramer Ltd., Nueva York, EEUU.
- Vonberg, R.P. y Gastmeier, P.** (2006). Nosocomial *aspergillosis* in outbreak settings. *The Journal of Hospital Infection*, 63 (3): 246-254.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, L.T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., y Kuiper, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Wagacha, J.M. y Muthomi, J.W.** (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (1): 1-12.
- Walker, R. y Larsen, J.C.** (2005). Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants*, 22: 6-9.
- Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E. y O'Donnell, K.** (2002). Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (14): 9278-9283.
- Watanabe, T.** (1994). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Lewis Publishers, Los Angeles, EEUU.
- Wei, R.D., Strong, F.M. y Smalley, E.B.** (1971). Incorporation of chlorine-36 into ochratoxin A. *Applied Microbiology*, 22 (3): 276-277.
- Werck-Reichhart, D. y Feyereisen, R.** (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1 (6): 1-9.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Nueva York, EEUU. Págs. 315-322.
- Wilbur, W.J. y Lipman, D.J.** (1983). Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 726-730.
- Wilhem, J. y Pingoud, A.** (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem: a European journal of chemical biology*, 4 (11): 1120-1128.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.E., Levak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.C.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6335.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, Y., Johnson, E.F. y McRee, D.E.** (2000) Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular Cell*, 5: 121-131.
- Wilson, D.M., Mubatanhema, W. y Jurjevic, Z.** (2002). Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504: 3-17.
- Witter, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. y Rasmussen, A.P.** (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22: 130-138.
- Wolff, J. Bresch, H., Chalmokow-Bodechtel, C., Engel, G., Gareis, M., Majerus, P., Rosner, H. y Scheuer, R.** (2000). Ochratoxin A: Contamination of Foods and Consumer Exposition, Final Evaluation. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51 (4-5): 115-117.
- Wösten, H.A.B., Scholtmeijer, K. y de Vries, R.P.** (2007). Hyperproduction of enzymes by fungi. En: Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. Págs. 183-196.
- Yan, K., Dickman, M.B., Xu, J.R. y Leslie, J.F.** (1993). Sensitivity of field strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*) to benomyl and hygromycin B. *Mycologia*, 85: 206-213.
- Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M. y Nishimura, K.** (2001). Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters*, 200 (2): 241-6.
- Young, C., McMillan, L., Telfer, E. y Scott, B.** (2001). Molecular cloning and genetic analysis of an indole-diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli*. *Molecular Microbiology*, 39 (3): 754-764.
- Yu, J.H., Chang, P.K., Payne, G.A., Cary, J.W., Bhatnagar, D. y Cleveland, T.E.** (1995). Comparison of the *omtA* genes encoding O-methyltransferases involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Gene*, 163: 121-125.
- Yu, J., Chang, P.K., Cary, J.W., Bhatnagar, D. y Cleveland, T.E.** (1997). *avnA*, a gene encoding a cytochrome P-450 monooxygenase, is involved in the conversion of averantin to averufin in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4): 1349-1356.
- Yu, J., Bhatnagar, D. y Cleveland, T.E.** (2004a). Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters*, 564 (1-2): 126-130.

- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. y Bennett, J.W.** (2004b). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1253-1262.
- Zachová, I., Vytrasova, J., Peichalova, M., Cervenka, L. y Tavcar-Kalcher, G.** (2003). Detection of aflatoxigenic fungi in feeds using the PCR method. *Folia Microbiologica*, 48(6): 817-821.
- Zhang, S., Monahan, B.J., Tkacz, J.S. y Scott, B.** (2004). Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11): 6875-6883.
- Zhao, J., Kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z. y Wang, D.** (2001). Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (6): 2261-2266.
- Zimmerli, B. y Dick, R.** (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13: 655-668.

Los resultados mostrados en esta tesis han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

- Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T. y Vázquez, C. (2005). "PCR detection assay for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species". *International Journal of Food Microbiology*, 104: 207-214.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T. (2005). "Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays". *FEMS Microbiology Letters*, 245: 353-361.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Jurado, M., López-Errasquín, E, Vázquez C y González-Jaén, M.T. (2006). "PCR assay for identification of *Aspergillus* section *Nigri* using internal transcribed spacer regions 1 and 2". *Recent Research Developments in Multidisciplinary Applied Microbiology*. Págs. 316-321.
- González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez C. y Patiño, B. (2008). "Highly sensitive PCR-based detection method specific to *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants*, 25: 758-764.
- Patiño, B., Vázquez, C., González-Salgado, A., Gil, J. y González-Jaén, M.T. (2008). "PCR: Una herramienta estratégica para la prevención de ota en vinos (ISSN 0029-7127)". *Le Bulletin de L'oiv, Organisation Internationale de la vigne et du vin*, París, 80: 389-396.
- González-Jaén, M.T., Marín, P\*, González-Salgado, A\*, Vázquez-Estévez, C., Aparicio-Gutiérrez, N., Patiño-Álvarez, B., Fernández-Hevia, C. y Esteban-Torres, M.M. (2008). "Detección de especies fúngicas productoras de toxinas en cereales españoles. Utilidad de los métodos basados en el ADN para predecir el riesgo de micotoxinas en cereales". Instituto Tecnológico Agrario ITACYL, Revista Innovación y Tecnología Agroalimentaria, 3: 36-43.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Jil-Serna, J. Vázquez C. y González-Jaén, M.T. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rDNA. En proceso de revisión. Revista *FEMS Microbiology Letters*.
- Marín, P\*, González-Salgado, A\*, Jurado, M. Vázquez C., Patiño, B. y González-Jaén, M.T. Mycotoxin risk in cereals of Spain. Enviado para publicación. Revista *International Microbiology*.